

Universitäts-Frauenklinik am Klinikum Südstadt Rostock  
Prof. Dr. med. Volker Briesse

**Die konzentrationsabhängige Wirkung der  
lignanangereicherten Rohextrakte aus dem  
Leinsamen *Linum usitatissimum* und dem  
Kürbiskern aus dem Gartenkürbis  
*Cucurbita pepo* auf die Proliferation von  
Mammacarcinomzellen *in-vitro***

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)  
der Medizinischen Fakultät  
an der Universität Rostock

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

von Annett Uhl  
geboren am 20. Mai 1980 in Forst/ Lausitz

*urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0074-7*

Gutachter:

Herr Prof. Dr. med. Volker Briele  
Frau PD Dr. rer. nat. Sybille Abarzua  
Herr PD Dr. med. Ioannis Mylonas

Tag der Einreichung: 19.06.2008

Tag der Verteidigung: 14.04.2009



# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

1.1 Das Mammacarcinom	
1.1.1 Inzidenz in der westlichen Welt	9
1.1.2 Inzidenz auf dem asiatischen Kontinent	9
1.1.3 Der Einfluss der Phytoestrogene auf das Mammacarcinom	10
1.2 Phytoestrogene	
1.2.1 Einteilung, Struktur und Vorkommen	11
1.2.2 Häufige Phytoestrogene unseres Kulturkreises: Die Lignane	12
1.2.3 Metabolismus und Bioverfügbarkeit der Lignane	13
1.2.4 Estrogenrezeptor-abhängiger Wirkmechanismus der Phytoestrogene	14
1.3 Der Estrogenrezeptor	
1.3.1 Estrogenrezeptorsubtypen	14
1.3.2 Aufbau der Estrogenrezeptoren	15
1.3.3 Mechanismus der Estrogenrezeptor-vermittelten Signaltransduktion	16
1.4 Zielsetzung der Arbeit	18

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte	20
2.1.2 Chemikalien	20
2.1.3 Materialien für die Zellkultur	21
2.1.4 Materialien für die immunhistochemischen Untersuchungen	21
2.1.5 Materialien für die Rohextrakterstellung	22
2.1.6 Materialien für die Bioassays	22
2.1.7 Auswahl der Zelllinien	23

### 2.2 Methoden

2.2.1 Die Zellkultivierung	23
2.2.2 Die immunhistochemischen Untersuchungen	24
2.2.3 Die Herstellung der Rohextrakte	
2.2.3.1 Herstellung des Leinsamenrohextraktes	25
2.2.3.2 Herstellung des Kürbiskernrohextraktes	27
2.2.4 Die massenspektrometrische Analyse der Rohextrakte	
2.2.4.1 Die High Performance Liquid Chromatography-Massenspektrometrie des Leinsamenrohextraktes	28
2.2.4.2 Die Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie des Kürbiskernrohextraktes	29
2.2.4 Die Zellaussaat für die Expositionsuntersuchungen	30
2.2.5 Die Bioassays	
2.2.5.1 MTT-Test	31
2.2.5.2 BrdU-Test	32
2.2.5.3 Zytotoxizitätstest	33
2.2.6 Statistik	33

### **3. Ergebnisse**

3.1 Die Ergebnisse der Zellkultivierung	
3.1.1 Kultivierung der Zelllinie MCF-7	35
3.1.2 Kultivierung der Zelllinie T47D	35
3.1.3 Kultivierung der Zelllinie HCC-70	36
3.1.4 Kultivierung der Zelllinie BT20	37
3.2. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen	
3.2.1 Rezeptorstatus der Zelllinie MCF-7	38
3.2.2 Rezeptorstatus der Zelllinie T47D	39
3.2.3 Rezeptorstatus der Zelllinie HCC-70	40
3.2.4 Rezeptorstatus der Zelllinie BT20	41
3.3 Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Rohextrakte	
3.3.1 Ergebnisse der High Performance Liquid Chromatography-Massenspektrometrie des Leinsamenrohextraktes	42
3.3.2 Ergebnisse der Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie des Kürbiskernrohextraktes	43
3.4 Statistik	45
3.5 Die Ergebnisse für die Testdurchläufe der Negativkontrollen 1 und 2	45
3.6 Die Ergebnisse der Bioassays für die Exposition mit dem Leinsamenrohextrakt	
3.6.1 Ergebnisse der Zelllinie MCF-7	48
3.6.2 Ergebnisse der Zelllinie T47D	54
3.6.3 Ergebnisse der Zelllinie HCC-70	59
3.6.4 Ergebnisse der Zelllinie BT20	65
3.7 Die Ergebnisse der Bioassays für die Exposition mit dem Kürbiskernrohextrakt	71

### **4. Diskussion**

4.1 Diskussion der Ergebnisse für die Exposition mit dem Leinsamenrohextrakt	77
4.2 Diskussion der Ergebnisse für die Exposition mit dem Kürbiskernrohextrakt	80
4.3 Wirkmechanismen der Phytoestrogene	
4.3.1 Estrogenrezeptor-abhängige Signaltransduktion	80
4.3.2 Estrogenrezeptor-unabhängige Signaltransduktion	81
4.3.3 Eigene Betrachtungen	82
4.4 Proliferativ-wirksame Substanzen im Leinsamenrohextrakt	82
4.5 Die Stimulation mit 17- $\beta$ -Estradiol	83
4.6 Methodische Aspekte	
4.6.1 Methoden der immunhistochemischen Untersuchungen	84
4.6.2 Unterschiede in MTT- und BrdU-Test	85
4.6.3 Fehleranalyse	85
4.7 Die Frage der relevanten Konzentrationen	87
4.8 Empfehlungen zur Einnahme von Leinsamen und Kürbiskern	88
4.9 Ausblick	90

<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>91</b>
--------------------------------	-----------

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	alpha
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AF	Aktivierungsfunktion
AIB1	Amplified in breast cancer 1
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-Triphosphat
$\beta$	beta
BCAR	Breast Cancer Anti-estrogen Resistance
BMI	Body-Mass-Index
BrdU	5-Bromo-2'-deoxy-Uridine
BSA	Rinderserumalbumin
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	DesoxyriboNucleotidAcid
EDTA	Ethylene Diamine Tetra-Acetate
EGF	Epidemal growth factor
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ER	Estrogenrezeptor
ERE	Estrogenresponsive Elemente
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
°C	Grad Celsius
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Acid
HPLC-MS	High performance liquid chromatography-Massenspektrometrie
Hsp	Hitzeschockprotein
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IC <sub>50</sub>	Inhibierende Konzentration, 50 %
IGF	Insulin-like growth factor
i.v.	intravenös
kDa	KiloDalton
KW	KiloWatt
KRE	Kürbiskernrohextrakt
KV	KiloVolt
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LC-MS	Liquid-Chromatography-Massenspektrometrie
LRE	Leinsamenrohextrakt
m	Masse
M	Molar
MAP-Kinasen	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	MilliMolar
mRNA	messenger - RiboNucleotidAcid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid
NADPH	Reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NLS	Nukleäre Lokalisierungssequenz
nm	Nanometer
Ns	nicht signifikant
o.g.	oben genannte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
%	Prozent
Py-FIMS	Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie
q	Teilchenanzahl
RNA	RiboNucleotidAcid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
SERM	Selektive Estrogenrezeptor-modulierende Verbindung
SHGB	Sexualhormon-bindendes Globulin
sog.	so genannte
S-Phase	Synthesephase
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TGF-β	Tumor growth factor beta
TII	Totalionenintensität
u.a.	unter anderem
U/ Min	Umdrehungen pro Minute
v.a.	vor allem
vgl.	vergleich
z.T.	zum Teil

## Thesen der Promotion

1. Der Einfluss von Phytoestrogenen auf die Proliferationsrate hormonabhängiger Mammacarcinome wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Endgültige Ergebnisse liegen derzeit weder für epidemiologische Studien, noch für tierexperimentelle Studien, noch für Zellkulturuntersuchungen vor.
2. Für Zellkulturuntersuchungen werden bis dato inhibitorische, stimulierende sowie in den letzten Jahren auch zunehmend biphasische Effekte dokumentiert. Die Beobachtung biphasischer Effekte auf die Proliferation von Mammacarcinomzellen *in-vitro* findet in der vorliegenden Arbeit Bestätigung.
3. Die Angaben proliferativ oder inhibitorisch wirksamer Phytoestrogenkonzentrationen divergieren. Während einige Autoren eine Tumorzellstimulation *in-vitro* durch Exposition mit isolierten Lignan (Enterolacton) bei Konzentrationen von 10 nM beobachten (Konzentrationen über 100 nM: tumorregressive Wirkung), beziffern andere Autoren eine stimulierende Wirkung auf Konzentrationen zwischen 10 µM und 50 µM (Konzentrationen darüber: hemmend).
4. In der aktuellen Literatur liegen Studien zum Einfluss von lignanangereicherten Rohextrakten *in-vivo* sowie Zellkulturuntersuchungen mit Exposition einzelner isolierter Lignane vor. Untersuchungen zur Exposition mit lignanangereicherten Rohextrakten *in-vitro* finden sich nicht. Diese bilden den Schwerpunkt dieser Arbeit.
5. Gesunde Ernährung und „BIO-Produkte“ gewinnen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Wichtig ist daher die Aufklärung eines möglichen Gefahrenpotenzials einer kurzfristigen Ernährungsumstellung mit Konsum eines einseitig hohen Anteils an Phytoestrogenen und resultierender Blutplasmakonzentration im möglicherweise stimulatив wirksamen Konzentrationsbereich. Auch mit dieser Frage beschäftigt sich die vorliegende Arbeit.
6. Lignane stellen die in unseren Breitengraden am häufigsten vorkommende Gruppe der Phytoestrogene dar. In der Vergangenheit fokussierten sich Studien vornehmlich auf die Untersuchung von Phytoestrogenen aus der Gruppe der Isoflavone. Erst kürzlich scheint das Interesse an anderen Phytoestrogenen - wie den Lignan - zu wachsen.
7. Trotz des Nachweises seines hohen Gehaltes an Lignan finden sich in der Literatur bisher keine Zellkulturuntersuchungen zum Kürbiskern. Dieser wird u.a. in der vorliegenden Arbeit untersucht.
8. Den besterforschten Wirkmechanismus der Phytoestrogene stellt der ER-abhängige Wirkmechanismus dar. In den letzten Jahren gehäuft werden jedoch ebenso inhibitorische sowie proliferative Effekte von Phytoestrogenen auf ER-negative Mammacarcinomzellen beobachtet. Unsere Ergebnisse zur ER-negativen Zelllinie BT20 bestätigen die Vermutung, dass bei der proliferationsbeeinflussenden Wirkung der Phytoestrogene neben ER-abhängigen ebenfalls ER-unabhängige Wirkmechanismen in Betracht gezogen werden müssen.



9. Wie unsere Ergebnisse bestätigen, haben hohe Konzentrationen pflanzlicher Estrogene das Potenzial zur Tumorregression. Die Diskussion über den Einsatz von Phytoestrogenen zur adjuvanten Chemotherapie bzw. postoperativen Nachsorge für hormonabhängige Mammacarcinome sollte daher vorangetrieben werden.
10. Unsere Experimente zeigen ebenfalls einen inhibierenden Einfluss auf die Proliferation hormonunabhängiger Mammacarcinomzellen. Es sollte daher ebenso für die Behandlung ER-negativer Mammacarcinome ein Einsatz von Phytoestrogenen in Betracht gezogen werden.

# **1. Einleitung**

## **1.1 Das Mammacarcinom**

### **1.1.1 Inzidenz in der westlichen Welt**

Mit seiner hohen Prävalenzrate steht das Mammacarcinom als häufigstes Malignom der Frau nach wie vor im Vordergrund des gynäkologischen Alltags [105, 178]. Zahlreiche Studien belegen eine signifikant zunehmende Brustkrebsrate bei Frauen in den USA bis Anfang der 90iger Jahre [2, 44, 47, 165]. In den Folgejahren scheint dieser Anstieg erheblich schwächer auszufallen und eine Plateauphase zu erreichen [149, 165]. Aktuell publizierte Studien konstatieren einen Abfall der Inzidenzraten zwischen den Jahren 1999 und 2003 in den USA. Dies wird vornehmlich der breiten Durchsetzung von Screening-Programmen (wie der Mammographie) sowie Veränderungen in den Strategien der postmenopausalen Hormontherapie zugeschrieben [12, 80, 136].

In den Ländern Europas lassen sich ebenfalls jahrzehntelang stark ansteigende Mammacarcinominzidenzen verfolgen [1, 14, 24, 66]. Nach diversen aktuellen Studien (Publikationen: 2007) erhöht sich auf dem europäischen Kontinent entgegen der Entwicklung in den USA auch weiterhin die Inzidenzrate der Mammacarcinome [13, 17, 51]. Sinkende Fallzahlen werden lediglich für die Mortalität festgestellt. Im Gegensatz dazu werden in einer norwegischen Studie (Datenerhebung zwischen 1990-2003) nach anfänglich steigender Brustkrebsinzidenz erniedrigte Inzidenzraten für ältere Frauen (Alter zwischen 50 und 69 Jahren) beschrieben. Weitgehend stabil bleibt hier die Brustkrebsrate bei jüngeren Frauen im Alter zwischen 20 und 49 Jahren und bei Frauen älter als 74 Jahre [70].

Nach einer dänischen Studie könnten Risikofaktoren wie ein hohes Alter bei der Geburt des ersten Kindes sowie das zunehmende Auftreten von Adipositas in der Bevölkerung einen erneuten Aufwärtstrend der Brustkrebsinzidenz verursachen [107].

### **1.1.2 Inzidenz auf dem asiatischen Kontinent**

Im Kontrast zur westlichen Welt stellt die erniedrigte Inzidenz und Mortalität von Tumoren der weiblichen Brustdrüse in der asiatischen Bevölkerung ein bekanntes Phänomen dar [23, 116, 145]. Ursächlich werden hierfür vor allem der Lebensstil und diätetische Faktoren verantwortlich gemacht [2, 6, 116]. Den Lebensstil betreffend kommt Aspekten wie Adipositas [140], Alkoholkonsum [74, 103] und sportliche Betätigung [19, 71, 159] in der Tumorentstehung eine zum großen Teil erwiesene Bedeutung zu. Hinsichtlich diätetischer Faktoren spielen Quantität [167, 169] und Qualität [33, 97] zugeführter Nahrungsfette sowie antioxidative Effekte einer obst- und gemüsereichen Diät [117, 152] vermutlich eine erhebliche Rolle.

Die asiatische Ernährungsweise vereint einige grundsätzlich tumorpräventive Merkmale: Sie ist außerordentlich fettarm und vegetarisch gewichtet. Zudem wird vermutet, dass pflanzliche Nahrungsbestandteile der asiatischen Diät - wie die Phytoestrogene, insbesondere aus Sojaprodukten - das Auftreten hormonabhängiger Neoplasien durch Veränderung der Produktion, des Stoffwechsels und der Wirkungsweise von Steroidhormonen beeinflussen können [2, 6, 30]. Gestützt wird die Vermutung lokaler Ursachen für die erniedrigte Brustkrebsrate auf dem asiatischen Kontinent durch die Beobachtung, dass sich bei in die westliche Welt emigrierten asiatisch-stämmigen Frauen eine Umkehr dieses Effektes mit einer erneuten Zunahme der Brustkrebsinzidenz verzeichnen lässt [79, 145].

### 1.1.3 Der Einfluss der Phytoestrogene auf das Mammacarcinom

**Epidemiologische Studien** weisen in Form von Fall-Kontroll-Studien eine positive Korrelation einer hohen **Einnahme von Phytoestrogenen** mit einhergehendem verminderten Brustkrebsrisiko nach (Sojaprodukte [97, 168]; Genistein [116], Daidzein sowie Matairesinol [102]). In anderen retrospektiven Fall-Kontroll-Studien wird ein Zusammenhang zwischen hohen **Plasmaenterolactonspiegeln** und erniedrigtem Brustkrebsrisiko festgestellt [2, 20, 77, 131]. Dabei liegen nach einer Studie in Deutschland (Piller et al.) die durchschnittlichen Plasmaenterolactonspiegel von Brustkrebspatientinnen (6,3 nmol/l, entsprechend 1,9 µg/ml) deutlich unter denen der tumorfreien Kontrollgruppe (9,7 nmol/l, entsprechend 2,9 µg/l) [131]. Dazu im Widerspruch werden in einer kürzlich publizierten dänischen Fall-Kontroll-Studie keine Effekte von hohen Lignan-Plasmaspiegeln (Enterodiol und Enterolacton) auf das Brustkrebsrisiko beobachtet; lediglich hohe Genistein-Level seien mit reduziertem Brustkrebsrisiko assoziiert [158].

Diverse Fall-Kontroll-Studien weisen niedrige **Lignanlevel** (Enterodiol und Enterolacton) **im Urin** bei Patienten mit Brustkrebs nach [2, 7, 9, 43]. Offenbar zeigt sich diese negative Korrelation ausgeprägter bei Frauen mit hohem Body-Mass-Index (BMI) bzw. Hüft-Taille-Verhältnis sowie niedrigem Blutspiegel von Sexual-Hormon-Binding-Globulin (SHBG) und erhöhtem Steroidhormonlevel [43].

Fraglich bleibt, ob Lignane eine protektive Wirkung bezüglich der Carcinogenese von Mammatumoren ausüben oder lediglich einen Biomarker für eine gesunde Ernährung darstellen [41]. In prospektiven Studien lässt sich ein protektiver Effekt von pflanzlichen Estrogenen in Hinblick auf die Inzidenz eines Mammacarcinoms bisher nicht nachweisen [74, 84, 86]. Eine englische Studie konstatiert sogar ein erhöhtes Brustkrebsrisiko nach Exposition mit Isoflavonen (signifikant für Equol und Daidzein) [61].

**Tierexperimentelle Studien** zum Verhalten von Mammacarcinomen unter dem Einfluss von Phytoestrogenen erbringen folgende Ergebnisse: Beobachtungen verschiedener Autoren zufolge lassen sich im Modellversuch an nackten Mäusen mit etablierten MCF-7-Tumoren durch **subkutane Injektionen von Lignan** signifikante Tumorregressionen erreichen [18, 132] (Genistein stimuliert dagegen das Tumorwachstum) [132]. Ähnliche Ergebnisse können auch durch **Leinsamen-Supplementierung der Nahrung** von Nacktmäusen mit etablierten Mammacarcinomzellen (MCF-7, MDA-MB-435) nachgewiesen werden [18, 38, 137]. Zusätzlich zur Tumoringhibition tritt hierbei eine Reduktion der Metastaseninzidenz auf [38]. Wie vorstehend als Effekt subkutaner Genistein-Injektionen beschrieben, kommt es auch unter Diät mit Sojazusatz zu einem beschleunigten Tumorwachstum. Die Zufütterung von Leinsamen negiert den tumorstimulierenden Effekt des Sojaproteins [137]. Bei unter Carcinogen-Exposition stehenden Ratten kommt es nach **Nahrungssupplementierung** mit aus Leinsamen isoliertem **Secoisolariciresinol** zu einer signifikanten Tumorreduktion [154].

Newbold et al. belegen für **Genistein** im Tierexperiment eine carcinogene Potenz hinsichtlich der Entwicklung uteriner Adenocarcinome bei **neonataler Exposition** [124]. Dagegen beobachten Gallo et al. keine Effekte auf das Tumorwachstum von MCF-7 und MDA-MB-231 durch Supplementierung der Nahrung athymischer Mäuse mit Sojaextrakt [57].

Derzeit existieren keine widerspruchsfreien Ergebnisse. Nach wie vor ist die Frage eines präventiven Effektes oder einer potenziellen Gefahr der Carcinomtriggerung bei Konsumierung pflanzlicher Estrogene umstritten [4, 95, 115].

## 1.2 Phytoestrogene

### 1.2.1 Einteilung, Struktur und Vorkommen

Phytoestrogene sind weit verbreitete nicht-steroidale Pflanzenbestandteile, die eine strukturelle Ähnlichkeit zum Sexualhormon Estradiol aufweisen. Aus chemischer Sicht zählen Phytoestrogene zu den Polyphenolen [41]. Ihre Unterteilung erfolgt im Wesentlichen in die folgenden Gruppen: die Isoflavone und andere Flavonoide, die Lignane, die Coumestane und die Stilbene [122].

**Flavonoide**, die im Pflanzenreich am häufigsten vorkommenden Polyphenole, beinhalten mehr als 5000 Substanzen, welche in 6 Subgruppen unterteilt werden können. Darunter befinden sich die Flavone (z.B. Apigenin, Luteolin), Flavonole (z.B. Quercetin, Kaempferol), Flavanone (z.B. Naringenin, Hesperidin), Flavanole (z.B. Catechin, Epicatechin, Galocatechin), Anthocyanidine (z.B. Cyanidin) und die Isoflavone [122].

Die **Isoflavone** stellen die größte dieser Subgruppen dar. Sie haben ihr natürliches Vorkommen vor allem in Sojaprodukten, Kleesprossen, Bohnen, Erbsen und weiteren Gemüsearten sowie in Obst [95]. Bedeutsam unter den bisher isolierten Isoflavonen sind vor allem Genistein und Daidzein. Aber auch Glycitein, Formononetin und Biochanin A sind dieser Gruppe zugehörig. Aus Daidzein entstehen Equol und O-Demethylangolensin. Genistein wird umgewandelt in 2-4-Hydroxy-Phenylpropanioc-Acid und 1,3,5-Trihydroxybenzene [41].

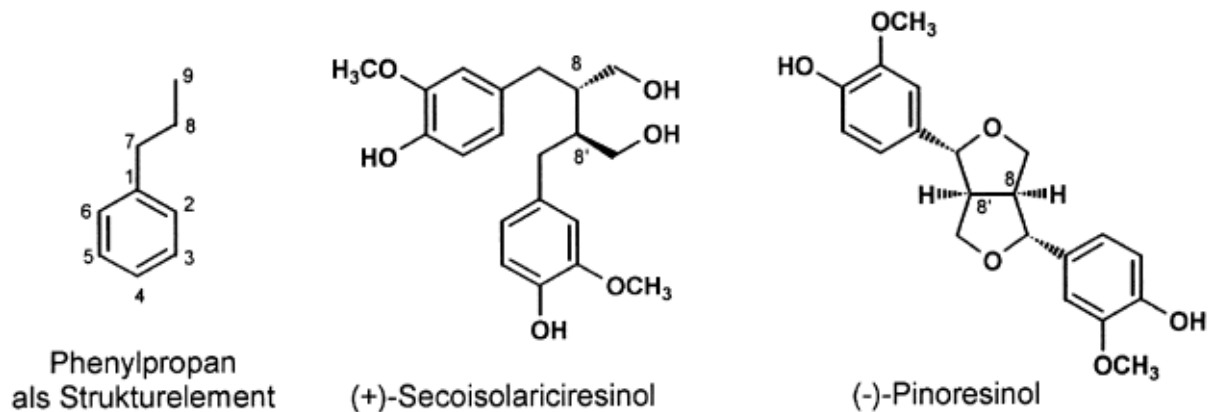
Die Gruppe der **Lignane** ist hauptsächlich in Ölsaaten und verschiedenen Getreidesorten beinhaltet, findet sich aber auch in Reis, Nüssen, Bohnen, Spargel, Broccoli u.a. Gemüsearten, sowie Beeren, Früchten und Wein (Tab. 1) [95].

**Tab. 1:** Lignangehalt verschiedener Lebensmittel. Angaben in µg/100g Trockengewicht [95].

Lebensmittel	Secoisolariciresinol	Matairesinol
Leinsamen	370 000	1100
Kürbiskerne	21 400	n. b.
Roggen	47–720	65
Weizen	8–280	n. n.
Reis	16–60	n. n.
Nüsse <sup>a</sup>	96–257	0–6
Bohnen <sup>a</sup>	64–3 050	n. n. bis Spuren
Spargel	6 510	n. b.
Zwiebeln	83	8
Broccoli	414	23
Karotten	192	3
Kartoffeln	10	6
Weißwein, µg/L	135–174	17–22
Rotwein, µg/L	686–1 280	74–98

<sup>a</sup>verschiedene Sorten; n. n. = unter der Nachweisgrenze; n. b. = nicht bestimmt

Lignane besitzen eine große strukturelle Vielfalt. Ihr grundsätzlicher Aufbau erfolgt aus zwei 8,8'-verknüpften Phenylpropangruppen mit variablen zusätzlichen Brücken und Bindungen über Sauerstoff- und Kohlenstoffatome (Abb. 1) [95].



**Abb. 1:** Struktur ausgewählter pflanzlicher Lignane [95].

Zu den wichtigen Vertretern der Lignane gehören Secoisolariciresinol und Matairesinol. Weitere bisher identifizierte Lignane sind Pinoresinol, Lariciresinol, Syringaresinol, 7-Hydroxymatairesinol, Isolariciresinol, Arctigenin und Actaealacton u.a.

Verbindungen der in unseren Breitengraden weniger präsenten Gruppe der **Coumestane** sind vorwiegend in Broccoli, Alfalfa-, Klee- und Sojasprossen enthalten [95]. Als wichtige Vertreter sind hier das Coumestrol und das 4'-Methoxycoumestrol zu nennen. Coumestane weisen eine enge strukturelle Ähnlichkeit zu den Isoflavonen auf [41].

Hauptvertreter der **Stilbene** ist das Resveratrol, welches als *cis*- und *trans*-Isomer existiert. Dieses Phytoalexin wird von Pflanzen reaktiv infolge einer Verletzung oder eines Pilzbefalls produziert. In der Pflanzenwelt ist Resveratrol wenig verbreitet, es wird vorwiegend in Weintrauben, Erdnüssen und Kiefern gefunden [41].

### 1.2.2 Häufige Phytoestrogene unseres Kulturkreises: Die Lignane

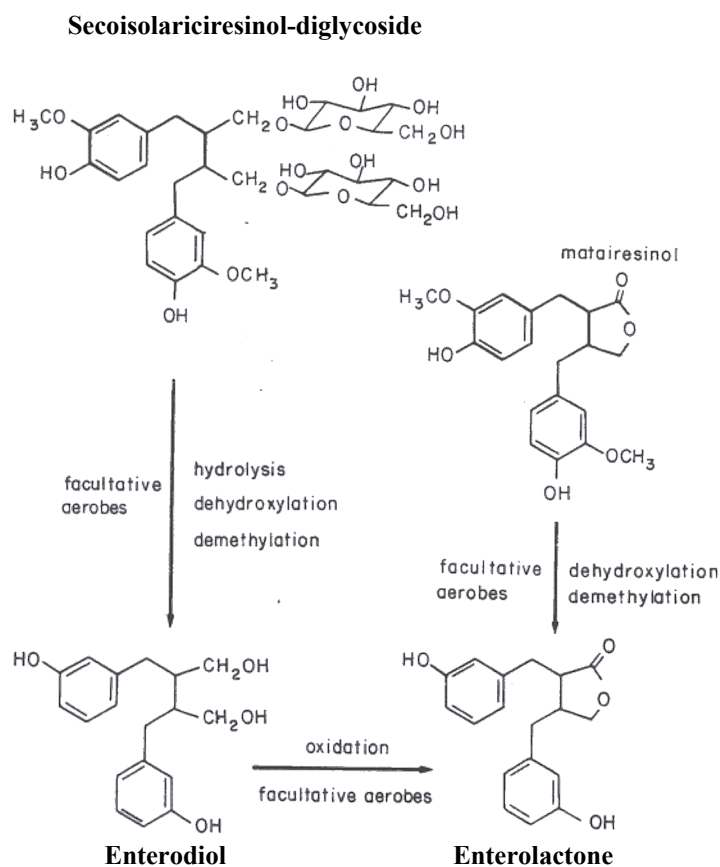
In pflanzlichen Lebensmitteln unserer Breitengrade sind die Phytoestrogene der Lignan-Gruppe am häufigsten anzutreffen [130]. Die lignanhaltigen Getreide bilden einen wesentlichen Teil der Nahrungsgrundlage der westlichen Kultur. Gemüse wie Spargel, Bohnen, Broccoli und Karotten genießen auf dem heimischen Ernährungsplan einen hohen Stellenwert. Laut einer europäischen Studie zu Phytoestrogenplasmakonzentrationen sind unter einer großen Auswahl häufig vorkommender Phytoestrogene die Konzentrationen für Enterolacton im Blutplasma am höchsten (durchschnittlich 2,7 µg/l). Für Frauen werden leicht höhere Spiegel im Vergleich zu Männern gemessen [130]. In der innereuropäischen Verteilung zeigen sich die Plasmaspiegel für Enterolacton in Dänemark am höchsten (8,2 µg/l) und in Norditalien am niedrigsten (2,1 µg/l). Die Plasmaenterolactonspiegel für Deutschland erreichen durchschnittliche Werte zwischen 2,7 µg/l (Heidelberg) und 3,1 µg/l (Potsdam) [130].

Dagegen ist der Konsum von Sojaprodukten in der westlichen Welt gewöhnlich niedrig. Aus Gründen der praktischen Relevanz bildet daher die Gruppe der Lignane das Augenmerk dieser wissenschaftlichen Arbeit.

### 1.2.3 Metabolismus und Bioverfügbarkeit der Lignane

Lignane werden im Dünndarm aufgenommen. Im menschlichen Organismus liegen sie hauptsächlich als Glucuronide vor [95]. Secoisolariciresinol wird unter sowohl aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen in Enterolacton und Enterodiol umgewandelt, ebenfalls konnte die Produktion kleiner Mengen Enterolacton aus Matairesinol, vorzugsweise unter anaeroben Bedingungen, nachgewiesen werden (Abb. 2) [22, 135]. Alle Metabolite sind bioaktiv [95].

Boriello et al. beobachten eine 40 %ige Konversion von Enterodiol zu Enterolacton innerhalb von 24 h durch humane Fäkalflora *in-vitro*. Enterolacton zeigt dagegen keinen weiteren Metabolismus [22].



**Abb. 2:** Produktion von Enterodiol und Enterolacton aus Secoisolariciresinol und Matairesinol [22].

Eine Interaktion der Lignanmetabolite mit dem Cytochrom-P450-System konnte *in-vitro* bereits beobachtet werden. Ihre Bedeutung *in-vivo* ist aktuell noch nicht aufgeklärt [95].

Es wird angenommen, dass die Bioverfügbarkeit der Phytoestrogene großen interindividuellen Schwankungen unterliegt und multifaktoriell beeinflusst wird. Die Mikroflora des Intestinaltraktes scheint dabei eine bedeutende Rolle in der Bewerksstellung der Effekte pflanzlicher Wirkstoffe zu spielen [3, 22]. Veränderungen der Darmflora beispielsweise durch Antibiotika oder Darmerkrankungen beeinflussen die resultierende Plasmakonzentration des Phytoestrogens [130, 144].

Weitere Einflüsse auf die Wirksamkeit pflanzlicher Estrogene üben Zeit und Dauer der Aufnahme, die freigesetzte Dosis, Metabolismus, endogener Estrogenstatus sowie der pflanzliche Ursprung des aufgenommenen phytoestrogenhaltigen Lebensmittels aus [122].

Zahlreiche Faktoren wie Umweltbedingungen (Licht u.a.), die pflanzliche Genetik und Artenvielfalt beeinflussen dabei den Inhalt einer Pflanze an Phytoestrogenen. Auch das Alter des Menschen bei Exposition scheint entscheidend zu sein. Eine kürzlich erschienene Studie über Effekte einer achtwöchigen diätetischen Isoflavon-Intervention auf die Isoflavonausscheidung im Urin junger Mädchen (8-14 Jahre alt) zeigt eine sehr hohe Isoflavonausscheidung im Vergleich zur Ausscheidung erwachsener Frauen. Diese Ergebnisse geben Hinweise auf einen geringeren intestinalen Abbau oder eine größere Absorption von Isoflavonen durch Jugendliche [111].

Ebenfalls ist die Bedeutung externer Einflüsse auf den Plasma-Enterolacton-Spiegel erwiesen. So wird Rauchen oder Fettleibigkeit mit einem niedrigen Plasmaenterolactonspiegel assoziiert, während Verstopfung in Verbindung mit einem erhöhten Spiegel steht [87]. Ebenso scheint der Konsum von Kaffee, Tee und Alkohol den Plasma-Enterolacton-Spiegel zu erhöhen [73].

Die Ausscheidung der Phytoestrogene erfolgt über Urin und Galle. Hierbei unterliegen sie partiell einem enterohepatischen Kreislauf [8, 135]. Die Menge des im Urin nachweisbaren Enterolactons liegt ein 5- bis 20-faches über dem Enterodiol-Level. Dagegen sind die ursprünglichen Lignane nur in Spuren zu finden [135].

## **1.2.4 Estrogenrezeptor-abhängiger Wirkmechanismus der Phytoestrogene**

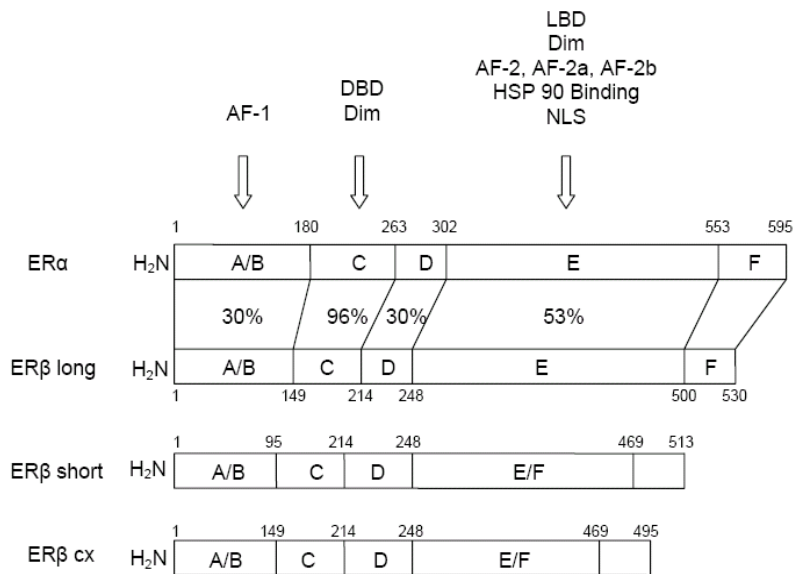
Die Effektmeechanismen pflanzlicher Estrogene sind noch nicht vollständig verstanden. Unter den biologischen Wirkmechanismen der Phytoestrogene ist der Estrogenrezeptor (ER)-vermittelte Wirkmechanismus der am besten erforschte. Demnach können Phytoestrogene, ähnlich dem Estradiol, eine schwache Bindung mit dem ER eingehen [96]. Die relative Bindungsaffinität der pflanzlichen Estrogene ist dabei mindestens 1000-fach geringer als diejenige des Estradiols.

Unterschieden werden zwei ER-Subtypen, ER  $\alpha$  und ER  $\beta$ . Offenbar aktivieren pflanzliche Estrogene den ER  $\beta$  stärker als ER  $\alpha$  [32, 90, 92, 93, 119], auch wenn grundsätzlich beide Rezeptortypen aktiviert werden können. Durch die am Rezeptor stattfindende Interaktion sind Phytoestrogene in der Lage, estrogene Aktivität, ähnlich der des weiblichen Sexualhormons 17- $\beta$ -Estradiol, zu initiieren oder zu blockieren. Die estrogene oder antiestrogene Wirkung der Phytoestrogene wird vom endogenen Hormonlevel beeinflusst [2].

## **1.3 Der Estrogenrezeptor**

### **1.3.1 Estrogenrezeptorsubtypen**

Der humane Estrogenrezeptor liegt in zwei Subtypen vor: ER  $\alpha$  und ER  $\beta$ . Der heute gut erforschte ER  $\alpha$  wurde 1962 von Jensen und Jacobson entdeckt und 1986 von Green und Greene in seiner Primärstruktur entschlüsselt [63, 81]. Es handelt sich hierbei um ein aus 595 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 66 kDa. ER  $\alpha$  weist eine hohe Interspezies-Homologie auf [164]. Die Identifizierung des ER  $\beta$  gelang 1995 durch Grandien und Gustafsson sowie 1996 durch Kuiper et al. [62, 94]. Es existieren mehrere Formen. Die kurze Variante ist aus 513 Aminosäuren aufgebaut, die physiologisch häufiger vertretene lange Variante beinhaltet 530 Aminosäuren [99]. Letztere verfügt über ein Molekulargewicht von 59 kDa. Entscheidende Unterschiede in der Funktion beider Rezeptorvarianten wurden bisher nicht gefunden. Eine dritte Variante, ER  $\beta$  cx, bildet ein Protein von 495 Aminosäuren (Abb. 3).



**Abb. 3:** Modularer Aufbau der Estrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  [186].

Unterschiede im Aufbau der Rezeptortypen  $\alpha$  und  $\beta$  bestehen hauptsächlich in der C-terminalen liganden-bindenden Domäne sowie in der N-terminalen Transaktivierungsdomäne (s.u.). ER  $\beta$  agiert u.a. scheinbar als Inhibitor der Transkriptionsaktivität des ER  $\alpha$  bei unversättigtem Hormonlevel und erniedrigt die zelluläre Sensibilität auf Estradiol [67]. Die vollständige Funktion ist nicht aufgeklärt.

Hinsichtlich der Gewebeverteilung ist ER  $\alpha$  insbesondere in Uterus, Leber, Herz und Niere vertreten. ER  $\beta$  wird dagegen vorwiegend in Eierstöcken, Prostata, Lunge, Gastrointestinaltrakt und Blase angetroffen [46]. Auch für Knochen-, Gehirn-, vaskuläres Endothel- und Gallengewebe ist sein Vorkommen nachgewiesen [95].

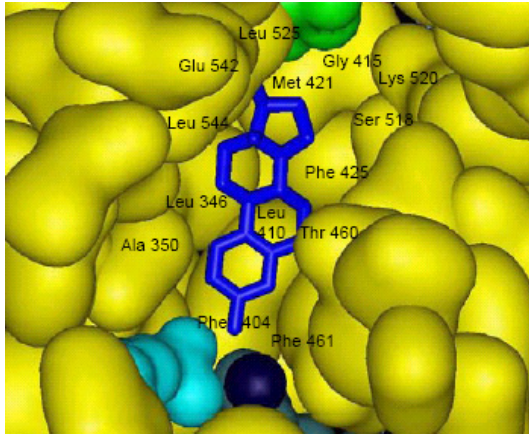
### 1.3.2 Aufbau der Estrogenrezeptoren

Estrogenrezeptoren sind nukleäre Hormonrezeptoren. Es handelt sich hierbei um Proteine aus der Gruppe der ligandenaktivierten Transkriptionsfaktoren, zu denen unter anderem die Steroid-, Thyroid- und Retinoidrezeptoren sowie verschiedene Orphan-Rezeptoren gehören [49, 109].

Die Primärstruktur des ER wurde bereits vollständig charakterisiert [65, 121]. Der Estrogenrezeptor setzt sich aus sechs funktionellen Domänen (A-F) zusammen. Die N-terminalen Domänen A und B sind für die Realisierung der konstitutiven, ligandenunabhängigen Aktivierungsfunktion (AF-1) verantwortlich. Ihr struktureller Aufbau ist unter den Steroidrezeptoren mit einer Übereinstimmung von nur 30 % zwischen ER  $\alpha$  und  $\beta$  von größter Variabilität [122]. Die Domäne C stellt mit einer Übereinstimmung von 96 % den konstantesten Bereich des Rezeptors dar [121]. Sie enthält die DNA-Bindungsdomäne [64], mit welcher die Erkennung und Bindung an spezifische Bindungssequenzen der DNA, den sogenannten Estrogenresponsiven Elementen (ERE) realisiert wird [89, 187]. Darüber hinaus enthält Domäne C eine Region zur Dimerisierung der Rezeptormoleküle sowie ein Kernlokalisierungssignal. Die D-Domäne stellt die am wenigsten charakterisierte Region des Estrogenrezeptors dar. Ihre Funktion liegt in der Bindung co-regulatorischer Proteine [78].



Zusätzlich gewährleistet sie die Konformationsänderung des Rezeptors nach Bindung des Liganden. Auf den C-terminalen Domänen E und F ist die Ligandenbindungsdomäne (LBD), mit der ligandenabhängigen Transkriptions-Aktivierungsfunktion (AF-2), lokalisiert [125, 64]. Abbildung 4 zeigt die LBD mit gebundenem Estradiol. Unter den ER-Subtypen wird für diese Region eine Homologie von 55 % gefunden [94].



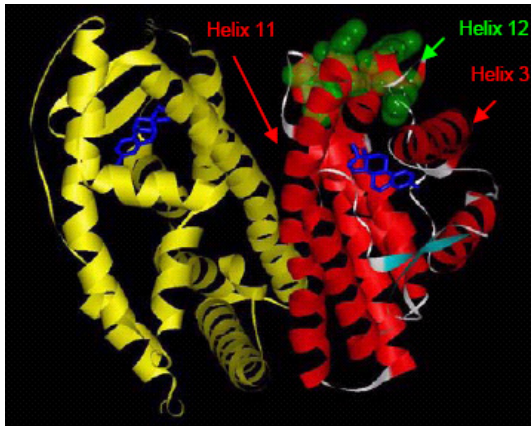
**Abb. 4:** Ligandenbindungsdomäne des Estrogenrezeptors mit gebundenem Estradiol [186].  
Gelb: Ligandenbindungsdomäne.  
Blau: Estrogenrezeptor.

Die LBD enthält außerdem eine Bindungsregion für das Hitzeschockprotein Hsp 90 [34]. Zudem hat sie eine modulierende Funktion auf die agonistische oder antagonistische Wirksamkeit von Antiestrogenen und der Transkriptionsaktivität bei Ligandenbindung [118].

### 1.3.3 Der Mechanismus der Estrogenrezeptor-vermittelten Signaltransduktion

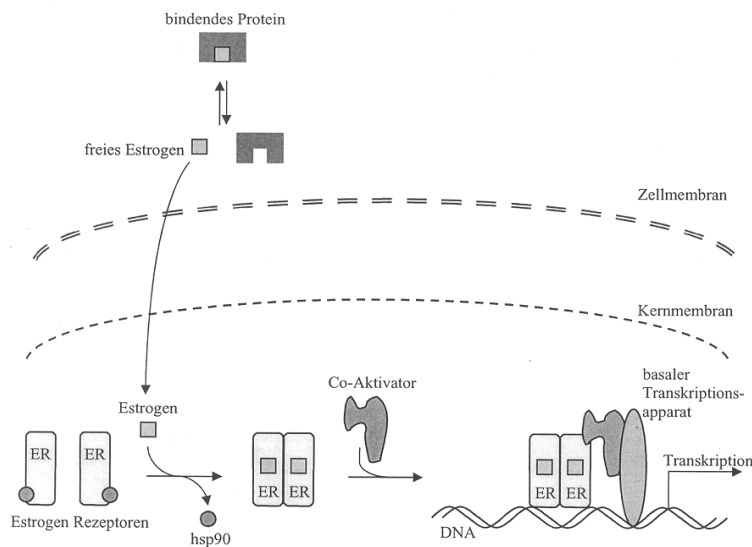
Steroidhormone, wie die Estrogene, wirken durch Änderung der Transkription spezifischer Gene. Aufgrund ihrer guten Membrangängigkeit gelangen die Estrogene durch die Plasmamembran in das Zytosol ihrer Zielzellen. Intrazellulär binden sie an den ER, der dort inaktiv im Komplex mit Proteinen vorliegt, welche die DNA-Bindungsdomäne blockieren [127]. Zu diesen Proteinen zählen Hitzeschockproteine (Hsp 90, Hsp 70) und andere Proteine [173, 127]. Die Bindung des Liganden bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors, in dessen Folge die blockierenden Proteine abdissoziieren und eine Dimerisierung eines Rezeptormoleküls mit anderen Rezeptormolekülen über die C-Domäne ermöglicht wird [122, 72, 127].

Abbildung 5 zeigt den dimerisierten ER mit gebundenem Estradiol.



**Abb. 5:** Dimerisierung des Estrogenrezeptors bei Estrogenbindung [186].  
Gelb, rot: Estrogenrezeptormoleküle.  
Blau: Gebundenes 17- $\beta$ -Estradiol.  
Grün: Verschluss der Ligandenbindungsdomäne durch die Helix.

Die durch die Abdissoziation der Proteine freigelegte nukleäre Lokalisierungssequenz (NLS) des Rezeptors gewährleistet den Transfer des Hormon-Rezeptor-Komplexes durch die Kernmembran in den Zellkern [72]. Dort erfolgt eine Bindung in der Promotorregion an spezifische Basensequenzen, die EREs (vgl. 1.3.1) [72] (Abb. 6). Der DNA-gebundene ER-Komplex interagiert dabei mit weiteren co-aktivierenden Proteinen und Transkriptionsfaktoren [122]. Offenbar erhöht die Dimerisierung des Rezeptors die Bindungsaffinität zu bestimmten DNA-Regionen [127].



**Abb. 6:** Mechanismus der ER-vermittelten Signalübertragung [127].  
ER: Estrogenrezeptor  
Hsp 90: Hitzeschockprotein 90

Die beschriebenen Abläufe führen zu einer Aktivierung oder Repression eines estrogen-regulierten Gens [72]. Bei Genaktivierung wird die Synthese der mRNA initiiert. Diese wird in das Zytoplasma ausgeschleust, wo an den Ribosomen die Translation zu den Effektorproteinen erfolgt, die die Hormonwirkung umsetzen [127].

Zumeist handelt es sich bei diesen Proteinen um Schlüsselenzyme des Stoffwechsels [72]. Zum ER-vermittelten Wirkspektrum gehören eine Vielzahl von Wachstums-, Differenzierungs- und Steuerungsprozessen. Bedingt durch den zur Neusynthese eines Proteins benötigten Zeitraum führen Estrogene zu eher längerfristigen Anpassungsreaktionen eines veränderten zellulären Metabolismus [72].

#### 1.4 Zielsetzung der wissenschaftlichen Arbeit

Aus den Betrachtungen zum Mammacarcinom als häufigstes Malignom der Frau und der kontroversen Diskussion des Einflusses pflanzlicher Estrogene - im besonderen der in unseren Breitengraden am häufigsten vertretenen Lignane - auf die Proliferation der Mammacarcinomzellen entstand die Fragestellung dieser Arbeit: Welche Aussagen können zur Wirkung lignanangereicherter Rohextrakte aus dem Leinsamen *Linum usitatissimum* und dem Kürbiskern des Gartenkürbis *Cucurbita pepo* auf die Wachstumsrate von Mammacarcinomzellen *in-vitro* getroffen werden?

Das Modell der Zellkultur *in-vitro* bildet die Basis zur Aufklärung des Einflusses pflanzlicher Estrogene sowie auch anderer sekundärer Pflanzenwirkstoffe auf menschliche Zellen. Es ist von großer Bedeutung hinsichtlich der Aufklärung von grundsätzlichen Wirkeffekten pflanzlicher Estrogene und gibt erste Hinweise auf die estrogene Potenz der jeweiligen Substanz [122], in Abhängigkeit von der applizierten Konzentration. Weiterhin gewährleistet sie Verlaufsbeobachtungen der Zellproliferationsrate ohne beeinflussende Störfaktoren des menschlichen bzw. tierischen Organismus; wie hormonelle Interaktionen, Stoffwechseleinflüsse, Regelkreisläufe sowie die Problematik der Wirkstoffkumulationen im Gewebe. Die Nutzung einer breiten Palette von verschiedenen *in-vitro* Testsystemen bildet die Grundlage für eine sich anschließende Beurteilung der Wirkeffekte im Tierversuch [122] und prospektive Studien am Menschen. Der Nachteil von *in-vitro*-Untersuchungen besteht allerdings darin, dass eine unmittelbare Übertragbarkeit auf den Menschen nicht möglich ist.

In bisher veröffentlichten *in-vitro*-Untersuchungen zum Einfluss von Phytoestrogenen auf Mammacarcinomzellen finden sich eine Vielzahl widersprüchlicher Ergebnisse (vgl. 4.2). Ein Großteil der aktuellen Ergebnisse ist auf die Charakterisierung der Effekte von Soja und den Isoflavonen Genistein und Daidzein limitiert, während nur wenige Untersuchungen zu Lignanen vorliegen [122]. Erst kürzlich scheint das Interesse an protektiven Einflüssen anderer Phytoestrogene zu wachsen [2].

Häufig wird dabei die *in-vitro*-Exposition mit einzelnen isolierten Lignan[en] [42, 102] bzw. mit den Säugerylignan[en] Enterolacton und Enterodiol untersucht [37, 160]. Der ganzheitliche Rohextrakt aus dem Leinsamen wird dagegen lediglich am Modell *in-vivo* erforscht [18, 38, 137]. Zur Wirkung des Leinsamen- und Kürbiskernrohextraktes in der Zellkulturuntersuchung finden sich in der aktuellen Literatur keine Studien. Hierin liegt das Potenzial zur Formulierung neuer Aussagen aus dieser Arbeit.

Wie aus Tab. 1 (vgl. 1.2.1) ersichtlich, ist unter den heimischen Pflanzen der Lignangehalt des Leinsamens besonders hoch. Der lignanangereicherte Rohextrakt aus dem Leinsamen *Linum usitatissimum* bildet deshalb die Grundlage unserer Forschungsarbeit. Es handelt sich hierbei um ein Substanzgemisch mit unterschiedlichen Anteilen verschiedener Lignane u.a. sekundärer Pflanzenstoffe. Zur Analyse des Rohextraktes siehe Inhaltspunkt 3.3. Im Verlauf unserer Studie stellte sich die Frage, in wie weit sich die Wirkung des Leinsamenrohextraktes von der Wirkung des Rohextraktes einer anderen lignanhaltigen Pflanze unterscheidet. Da laut Tab. 1 (vgl. 1.2.1) der Kürbiskern ebenfalls einen hohen Lignangehalt (Secoisolariciresinol u.a.) aufweist, fügten wir unserer Versuchsreihe zum Leinsamenrohextrakt weitere Untersuchungen zum Einfluss des Kürbiskernrohextraktes aus dem Gartenkürbis *Cucurbita pepo* auf die Proliferationsrate von Mammacarcinomzellen

hinzu. Auch hier liegt mit dem Rohextrakt ein Substanzgemisch vor, welches im Ergebnisteil analysiert wird (3.3).

Bisher unschlüssige Ergebnisse hinsichtlich eines ER-abhängigen Wirkmechanismus der Phytoestrogene führten weiterhin zur Integration mehrerer ER-positiver sowie einer ER-negativen Mammacarcinomzelllinie in den Versuchsablauf unseres Experimentes. Ziel ist die Beurteilung inhibitorischer bzw. stimulierender Effekte zweier lignanhaltiger Rohextrakte, die Untersuchung einer möglichen Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen eingesetzter Extraktkonzentration und Tumorproliferationsrate sowie Beobachtungen zu prinzipiell unterschiedlichen Verhaltensweisen ER-positiver und -negativer Zelllinien.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller/ Lieferant
Autoklav Typ T6	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Hannover
Digitale Mikroskop Kamera PC 1049	Canon Inc., Japan
Eismaschine AF 10	Scotsman
ELISA-Multiwell-Reader	SLT LABINSTRUMENTS GmbH, Crailsheim
Kühlschrank KTP 1730	Liebherr Premium
Magnetrotationsgerät Typ MR 2002	Heidolph
Mikroskop U-PMTVC	Olympus, Japan
Mikroskop „Axiostar plus“	Carl Zeiss Werk, Göttingen
Pipettierhilfe PhysioCare concept, verschiedene Volumina	Eppendorf Research
Sicherheitswerkbank Klasse 2 Typ H	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Tiefkühlgerät (-184 °C) K-Series	Cryostorage System Tec-Lab, Königsstein
Waage Typ BP 210 S	Sartorius AG, Göttingen
Wärmeschrank Typ SM 400	Memmert GmbH&Co, Schwabach
Vortexgerät Typ REAX 2000	Heidolph
Zentrifuge Universal 30 RF	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

#### 2.1.2 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller/ Lieferant
Destilliertes Wasser, steril	Sigma Chemical Company, St. Louis
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Vogler, Rotterdam
17- $\beta$ -Estradiol 103K11175 E2758-1G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol 70 %	Sigma Chemical Company, St. Louis
Ethanol 96 %, VbF B, vergällt	Zentralapotheke Rostock
Ethylacetat	Carl Roth GmbH&Co
Formaldehyd 4,0 %	Otto Fischar GmbH&Co KG, Saarbrücken
Formafix 4,0 %, gepuffert	Grimm med. Recycling GmbH, Torgelow
Methanol 99,8 %	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Petrolether	Carl Roth GmbH&Co
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), steril	Lonza, Verviers
2-Propanol 99,5 %	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Salzsäure 37 %, verdünnt	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Trypanblaulösung 0,4 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Xylol 98 %	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer

### 2.1.3 Materialien für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller/ Lieferant
Amphotericin B, 250 µl/ml, steril	PAN Biotech GmbH
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Phenolrot, mit Glukose 4,5 g/l, mit L-Glutamin, steril	Lonza, Verviers
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Linz
Gewebekulturplatten, 96 wells, F-Form, steril	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Penicillin/ Streptomycin Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Pipettenspitzen, verschiedene Größen, steril	Greiner Bio-one GmbH
Polypropylen-Reagenzgläser, 50 ml, steril	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Probenröhrchen 1,5 ml, steril	Nalgene® Cryoware TM, Rochester
Reagiergefäß, 1,5 ml	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) - 1640 Medium mit 25 mM HEPES, mit L-Glutamin	Promocell
Serologische Pipetten, 5 und 10 ml, steril	Greiner Bio-one GmbH
Trypsin-EDTA 0,05 %/ 0,02 % in D-PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Zählkammer Bürker-Türk	Fein-Optik, Jena
Zellkulturflaschen, 25, 75 und 150 cm <sup>2</sup> , steril	Nunclon TM, Roskilde

### 2.1.4 Materialien für die immunhistochemischen Untersuchungen

Bezeichnung	Hersteller/ Lieferant
Anti Estrogenrezeptor $\alpha$ , Mouse Monoclonal NCL-ER-6F11/2	Novocastra
Anti Estrogenrezeptor $\beta$ 1, Mouse, MCA 1974 IgG2a, PPG5/10	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH
<b>Vectastain® Elite ABC Kit</b>	Vector Laboratories, Inc., Burlingame
Blocking Serum, ultrafiltriert, Pferd S-2000	Vector Laboratories, Inc., Burlingame
Biotinylated Anti-Mouse IgG, Pferd BA-2000	Vector Laboratories, Inc., Burlingame
R.T.U Vectastain® Elite ABC Reagenz, PK-7100	Vector Laboratories, Inc., Burlingame
DAKO® DAB Chromogen tablets (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid)	DAKO Corporation, Carpinteria
Wasserstoffperoxid 35 %	Merck KGaA, Darmstadt
Hämalaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt
Kanadabalsam	Merck KGaA, Darmstadt
<b>ImPRESS™ Universal Kit</b>	Vector Laboratories, Inc., Burlingame
R.T.U Normal Horseserum 2,5 %	Vector Laboratories, Inc., Burlingame
ImPRESS™ Reagenz Anti-Mouse Ig, MP-7402	Vector Laboratories, Inc., Burlingame
<b>HISTOPRIME® HistoGreen Substratkit</b>	LINEARIS GmbH, Wertheim-Bettingen

HistoGreen Chromogen  
HistoGreen-Puffer  
HistoGreen Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

LINEARIS GmbH, Wertheim-Bettingen  
LINEARIS GmbH, Wertheim-Bettingen  
LINEARIS GmbH, Wertheim-Bettingen

### 2.1.5 Materialien für die Rohextraktherstellung

Bezeichnung	Hersteller/ Lieferant
Erlenmeyerkolben, 300 ml/ 500 ml	Carl Roth GmbH&Co
Rundkolben, 3 l	Schott Duran
Exsikkator	Carl Roth GmbH&Co
Gemüsemühle Typ 708 A	Krups
Glastrichter	Carl Roth GmbH&Co
Leinsamen, Samen <i>Linum usitatissimum</i> , Sorte „Barbara“	Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt MV, Rostock
Gartenkürbis, Kern <i>Cucurbita pepo</i> , Sorte „Gele Centenaar“	Landesamt für Verbraucherschutz, Land- wirtschaft und Flurneuordnung, Wünsdorf
Pasteurpipette, 150 mm	Carl Roth GmbH&Co
Pipettensauger	Carl Roth GmbH&Co
Rotationsverdampfer VV 2011	Heidolph
Siedesteine, „Boiling stones B“	Carl Roth GmbH&Co
Ultraschallbad 300 / H	Omnilab
Wasserbad Typ WB 2001	Heidolph

### 2.1.6 Materialien für die Bioassays

Bezeichnung	Hersteller/ Lieferant
<b>MTT Kit</b>	Roche Diagnostics GmbH
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) Labeling Reagenz	Roche Diagnostics GmbH
Solubilization Lösung, 10 % Natrium-Dodecyl- Sulfat in 0,01 molarer Salzsäure	Roche Diagnostics GmbH
<b>BrdU Kit</b>	Roche Diagnostics GmbH
5-Bromo-2'-deoxy-Uridine (BrdU) Labeling Reagenz	Roche Diagnostics GmbH
Inkubationspuffer, 66 mM Tris Puffer, 0,66 mM Magnesiumchlorid, 1 mM 2-Mercaptoethanol	Roche Diagnostics GmbH
Nuklease	Roche Diagnostics GmbH
BrdU - Antikörper, Fab Fragmente, Maus, peroxidasekonjugiert (25U)	Roche Diagnostics GmbH
ABTS - Substratpuffer	Roche Diagnostics GmbH
ABTS - Substrat	Roche Diagnostics GmbH
Substratverstärker	Roche Diagnostics GmbH
Fixative: Ethanol (70 %), in destilliertem Wasser und Salzsäure (Endkonzentration 0,5 molar)	

### **2.1.7 Auswahl der Zelllinien**

Für unsere Untersuchungen wählen wir drei ER-positive Mammacarcinomzelllinien unterschiedlichen Differenzierungsgrades. Um Hinweise zur ER-Abhängigkeit des Wirkmechanismus der Lignane zu erhalten, gliedern wir zusätzlich eine ER-negative Zelllinie in die Versuchsreihe ein. Alle verwendeten Zelllinien entstammen der Zellbank der American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA.

#### **1. MCF-7**

Die Zelllinie MCF-7, ATCC Katalog Nummer HTB-22, wird als Adenocarcinom der Brustdrüse mit epithelialer Morphologie typisiert [184]. Sie stellt eine ER-positive Zelllinie mit einer Verdopplungszeit von 29 h dar. MCF-7 stammt aus einer Zell-Isolierung aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen Kaukasierin.

#### **2. T47D**

Bei der Zelllinie T47D, ATCC Katalog Nummer HTB-133, handelt es sich um ein infiltratives, duktales Tumorzellgewebe der weiblichen Brustdrüse von epithelialer Morphologie. Neben der Exprimierung des ER können zusätzlich Rezeptoren für Calcitonin, Androgene, Progesteron, Glucocorticoide und Prolactin nachgewiesen werden [183, 184]. Die Verdopplungszeit beträgt 32 h. Die Zelllinie T47D entstammt dem Pleuraerguss einer 54-jährigen Patientin.

#### **3. HCC-70**

Bei der ER-positiven Zelllinie HCC-70 handelt es sich um primäres duktales Mammacarcinomzellgewebe von epithelialer Morphologie im TNM Stadium IIIa, Grad 3 [184]. HCC-70 wurde 1992 aus Zellen des Primärtumors einer 49-jährigen Patientin schwarzer Hautfarbe etabliert.

#### **4. BT20**

Die Zelllinie BT20 stellt eine ER-negative Mammacarcinomzelllinie epithelialer Morphologie dar. Sie ist befähigt, in Nacktmäusen ein Adenocarcinom zweiten Grades zu initiieren [183]. Obwohl als ER-negativ klassifiziert, exprimiert BT20 eine Estrogenrezeptor-mRNA, welche eine Deletion des Exons 5 aufweist. BT20 wurde 1958 aus dem Tumorschnittgewebe einer 74-jährigen Kaukasierin isoliert.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Die Zellkultivierung**

Die Zellen werden in einem Einfriermedium aus 20 % Fetalem Kälberserum (FKS), 70 % Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) bei -196 °C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Sie werden nach Angaben des Lieferanten aufgetaut und in DMEM aufgenommen. Mittels 10-minütiger Zentrifugation bei 1000 U/min und 25 °C erfolgt die Trennung der Carcinomzellen von dem DMSO-haltigen Einfriermedium. Nach Verwerfung des Überstandes werden die Zellen mit dem Kulturmedium versetzt und in Kulturflaschen ausgesät. Die Zellen wachsen als Monolayer unter humidifizierten Bedingungen bei 37 °C und 5 %igem CO<sub>2</sub>-Gehalt in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Alle 48 h erfolgt ein Mediumwechsel und die mikroskopische Begutachtung des Zellwachstums.

Bei konfluentem Zellrasen (ca. 80 %iger Bewuchs des Flaschenbodens) werden die Zellen



passagiert. Hierzu wird das Medium aus der Kulturflasche abgesogen und mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gespült. Das Ablösen des Zellrasens geschieht durch eine Trypsinierung (0,1 %iges Trypsin). Diese wird mit FKS-haltigem DMEM gestoppt. Es schließt sich eine Zentrifugation der Zellsuspension an (10 min bei 25°C und 1000 U/min). Daraufhin wird der Überstand verworfen, das abgesetzte Zellpellett durch Zugabe von Medium resuspendiert und in eine nächstgrößere Kulturflasche ausgesät bzw. dem Experiment zugeführt.

## **Lösungen und Zubereitungen**

Zellkulturmedium DMEM:	DMEM, Flasche 500 ml	
	FKS	10 %
	Penicillin/ Streptomycin	1 %
	Amphotericin B	0,5 %
Zellkulturmedium RPMI 1640:	RPMI Medium, Flasche 500 ml	
	FKS	10 %
	Penicillin/ Streptomycin	1 %
	Amphotericin B	0,5 %

Kulturmedien, PBS und Lösungen für die Zellkultur werden steril angesetzt bzw. vor Gebrauch sterilfiltriert.

### **2.2.2 Die immunhistochemischen Untersuchungen**

Die immunhistochemischen Untersuchungen erfolgen zur Analysierung des Rezeptorstatus für die Estrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  der verwendeten Zelllinien. Das Wirkprinzip besteht in einer Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei der verwendete Antikörper gegen den ER gerichtet und markiert ist. In einer Folgereaktion können über diese Markierung die Antikörper-gebundenen ER nachgewiesen werden. Hierzu verwendet man die Avidin-Biotin-Komplex(ABC)-Methode [76], wobei man sich die natürliche Affinität von Avidin zu Biotin zunutze macht. Dabei handelt es sich um eine hochsensitive immunoenzymatische Technik, die mittels drei sequentieller Schritte über einen primären Antikörper, einem biotingegebenen sekundären Antikörper und dem resultierenden Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex zum Nachweis zellulärer Antigene führt [76].

## **Durchführung**

Die Lösungen werden nach Herstellervorschrift angefertigt.

Für den Testansatz werden die Zellen analog 2.2.1 von der Kulturflasche gelöst und zentrifugiert. Das Zellpellett wird zunächst nochmals mit DMEM gewaschen und erneut zentrifugiert. Durch Versetzen mit einem Volumen von 10 ml Medium sowie anschließender Herstellung einer definierten Suspension aus 360  $\mu$ l DMEM, 20  $\mu$ l Trypanblau und 20  $\mu$ l Zellsuspension kann nun durch Zellzählung in der Bürker-Zählkammer die Zelldichte bestimmt werden. Auf einem teflonbeschichteten Objektträger mit drei Reservoiren werden je 300  $\mu$ l der Zellsuspension aufgetragen. Diese Objektträger gibt man in eine sterile feuchte Kammer (Petrischale). So verbleiben die Objektträger mit der Zellsuspension bis zur Konfluenz im Inkubator (37 °C, 5 %iger CO<sub>2</sub>-Gehalt in wasserdampfgesättigter Atmosphäre).

Nach der Adhärenz der Zellen dekantiert man das überschüssige Medium von den Objektträgern und lässt diese lufttrocknen. Zur Fixierung der Zellen nutzt man 4,0 %iges Phosphat-gepuffertes Formaldehyd. Es folgt eine dreimalige Spülung mit PBS, wobei dieses für jeweils 5 min den Objektträger bedeckt, danach verworfen und erneut auf den Objektträger aufgebracht wird. Zur Blockierung unspezifischer Hintergrundreaktionen erfolgt nun das Auftragen des in PBS verdünnten Pferdeserums (im Vectastain® *Elite* Kit vorhanden). Die Inkubationszeit dieses Arbeitsschrittes beträgt mindestens 20 min. Daraufhin wird der Überstand dekantiert.

Zur Lokalisation der Estrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  werden je 50  $\mu$ l des in PBS gelösten jeweiligen Primärantikörpers auf das entsprechende Objektträgerfeld pipettiert. Das verbleibende dritte Objektträgerfeld wird mit verdünntem Pferdeserum beschichtet und als Leerprobe mitgeführt. Die Inkubation erfolgt über Nacht (ca. 8 h) bei 4 °C.

### **Reaktionssubstrat: Diaminobenzidin**

Am Folgetag wird der Überstand dekantiert und dreimalig mit PBS gewaschen. Daraufhin werden alle Objektträgerfelder mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Vectastain® *Elite* Kit) für 30 min inkubiert. Erneut wird dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wird das Vectastain® *Elite* ABC-Reagenz aufgetragen und 30 min bei Raumtemperatur belassen. Zur farblichen Darstellung der positiven Reaktionen für den Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion wird Diaminobenzidin (DAB) genutzt.

Im Anschluss wird eine Gegenfärbung durchgeführt. Bevor die Zytospins mit Kanadabalsam eingedeckt werden, müssen sie mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und zweimal in Xylol gebracht werden. Nach Trocknung der Zytospins erfolgt die Begutachtung mikroskopisch.

### **Reaktionssubstrat: Histogreen**

Um eine Positivität der Reaktion kenntlich zu machen, wird außer dem o.g. Vectastain® *Elite* Kit noch ein weiteres Detektionskit verwendet. Hierfür wird das ImPRESS™ Kit und die Substratlösung Histogreen genutzt. Die Präparation der Objektträger erfolgt analog 2.2.2.

## **2.2.3 Die Herstellung der Rohextrakte**

### **2.2.3.1 Herstellung des Leinsamenrohextraktes**

Die Rohextrakte werden nach dem Verfahren zur Lignanisolierung nach Luyengi und Kinghorn hergestellt [106]. Die Herstellung erfolgt in Kooperation mit dem Fachbereich Biowissenschaften der Universität Rostock [180].

### **Aufbau und Durchführung**

Zur Herstellung des lignanangereicherten LRE wählen wir den Leinsamen *Linum usitatissimum* der Sorte „Barbara“.

Eine Leinsamenmenge mit dem Gewicht von 40 g wird mit einer Gemüsemühle zu Samenmehl gemahlen. Schritt zwei dient der Entfettung. Diese wird mittels Soxhletapparatur durchgeführt, welche sich wie folgt zusammensetzt (Abb. 7):



**Abb. 7:** Aufbau der Soxhletapparatur [180].

Die Basis der Apparatur bildet ein Wasserbad, das über einen Temperaturregler auf eine bestimmte Temperatur eingestellt werden kann. Im Wasserbad befindet sich freihängend ein Erlenmeierkolben mit 500 ml Petrolether, welchem sich ein Zwischenstück von zwei parallel laufenden Röhrensystemen anschließt.

Eine der Röhren ist mit einem Trichter verbunden. In diesem befindet sich auf einem Faltenfilter das Leinsamenmehl. Die zweite Röhre führt seitlich am Trichter vorbei zu einem sich oberhalb befindenden zweiten Röhrensystem mit externer Wasserkühlung. Von dort aus hat sie von oben Anschluss an den Trichter mit dem Leinsamenmehl.

### **Entfettung des Samenmehls**

Die Soxhletentfettung geschieht folgendermaßen: In dem auf 60 °C bis 70 °C erhitzten Wasserbad verdampft der im Erlenmeierkolben befindliche Petrolether. Der Etherdampf steigt

durch die Glasröhre - seitlich am Faltenfilter vorbei - zum oberen Abschnitt der Soxhletapparatur auf. Am dort integrierten wassergekühlten Röhrensystem kondensiert der Dampf und tropft durch den sich unmittelbar darunter befindenden Faltenfilter mit dem Samenmehl unter Herauslösung des Fettanteils des Leinsamenmehls zurück in den Kolben mit dem Petrolether. Dieser Vorgang wird nun stetig wiederholt, während sich dabei der Ether durch die Aufnahme der Fettsäuren gelb färbt. Das Leinsamenmehl im Faltenfilter dagegen erblasst. Nach 5-6 h ist zu beobachten, wie der durch den Filter tropfende Petrolether nahezu farblos erscheint. Es wird kein Fett mehr herausgelöst. Der Entfettungsvorgang ist beendet. Mit einer Ausgangsmenge von 40 g Leinsamen können etwa 23 g entfettetes Leinsamenmehl gewonnen werden. Dieses wird vor der weiteren Verarbeitung getrocknet.

## **Die Lignanextraktion**

Für die Lignanextraktion verwenden wir 20 g des entfetteten Samenmehls.

Das Mehl wird mit einem halben Teelöffel Siedesteine sowie 177,5 ml Methanol versetzt und im Wasserbad bei 70 °C unter Wasserkühlung für 15 min gekocht. Eine Abkühlphase schließt sich an.

Während des Kochprozesses erfolgt der Übergang der Inhaltsstoffe des Leinsamenmehls in das Lösungsmittel. Dieses wird im Folgenden durch einen Faltenfilter filtriert und anschließend im Rotationsverdampfer bei 40 °C eingeeengt. Wir beginnen hierbei mit einem Druck von 280 mbar (zum Abzug des Methanols) und regulieren den Druck dann im Intervall herunter bis auf 30 mbar (zum Abzug des Wassers). Noch vor vollständiger Extrakt Trocknung wird der Vorgang gestoppt. Die gewonnene Extraktionsmasse wird nun mit 6 ml Wasser versetzt und durch minutenlanges kräftiges Schütteln und Ultraschallbad in Lösung gebracht.

In einen Scheidetrichter umgefüllt, versetzen wir die Leinsamenrohextrakt-Wasser-Suspension mit 8 ml Ethylacetat. Da sich hierbei keine eindeutige Zweiphasenbildung erkennen lässt, überführen wir die Lösung in ein Reagenzgefäß und zentrifugieren für 3 min bei 10 000 U/min. Bei nun deutlicher Zweiphasenbildung wird die obere Phase mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesogen und in einen ausgewogenen Rundkolben gegeben, wobei darauf zu achten ist, dass keine Partikel der unteren Phase die extrahierte Lösung verunreinigen. Die untere Phase wird erneut mit 8 ml Ethylacetat aufgeschüttelt. Nach diesem Schritt ist eine Zweiphasentrennung deutlich erkennbar, die obere Schicht kann ohne Einsatz der Zentrifuge abgenommen werden.

Dieser Prozess wird nun insgesamt fünfmal hintereinander durchgeführt und die abgenommene Flüssigkeit jeweils in den Rundkolben überführt. Mittels Rotationsverdampfer engen wir anschließend den in Ethylacetat gelösten Extrakt bei 40 °C bis zur vollständigen Trocknung ein. Wiederum wird dabei der Druck von 280 mbar auf 30 mbar schrittweise herunterreguliert. Den letzten Schritt der Extrakterstellung stellt die Extrakt Trocknung über Nacht im Exsikkator mit Kieselgel dar. Während dieses Vorganges ist der Extrakt durch eine Silberfolie lichtgeschützt.

Aus einer Ausgangsmenge von 20 g entfetteten Leinsamenmehles gewinnen wir eine Rohextraktmenge von 138,1 mg.

### **2.2.3.2 Herstellung des Kürbiskernrohextraktes**

Zur Herstellung des lignanangereicherten KRE verwenden wir die Kerne des Gartenkürbis, *Cucurbita pepo*, der Sorte „Gele Centenaar“. Die Kürbiskerne werden vor Verarbeitung geschält und in der Gemüsemühle gemahlen. Die Extraktion erfolgt analog der Lignanisolierung aus dem Leinsamen (2.2.3.2) nach Luyengi und Kinghorn [106].

Zur Extrakterstellung setzen wir eine Ausgangsmenge von 20 g Kürbiskernmehl ein. Mittels Soxhletentfettung können hieraus 9,7 g entfettetes Kürbiskernmehl hergestellt werden. Der gewonnene Rohextrakt umfasst ein Gewicht von 53 mg.

#### **2.2.4 Die massenspektrometrische Analyse der Rohextrakte**

Um nachzuweisen, dass die hergestellten Rohextrakte tatsächlich die zu untersuchenden Lignane enthalten, werden die Extrakte in Kooperation mit dem Institut für Chemie der Universität Rostock [181] und dem Steinbeis-Transferzentrum Soil Biotechnology [182] bezüglich ihrer Inhaltsstoffe analysiert. Dabei wird für den LRE ein Screening mittels High Performance Liquid Chromatography-Massenspektrometrie (HPLC-MS), für den KRE ein Screening mittels Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie (Py-FIMS) durchgeführt. Das Prinzip der Massenspektrometrie wurde 1910 durch J. J. Thomson entwickelt [28]. Es stellt ein Verfahren zur Messung des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses ( $m/q$ ) von Teilchen dar. Ist die Ladung  $q$  bekannt, kann auf diese Weise die Masse  $m$  der Teilchen bestimmt werden. Bei bekanntem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis können des Weiteren Schlussfolgerungen auf Qualität und Quantität vorhandener Teilchen gezogen werden [29].

##### **2.2.4.1 Die High Performance Liquid Chromatography-Massenspektrometrie des Leinsamenrohextraktes**

Die chemische Analyse des lignanangereicherten LRE wurde innerhalb der Forschungsgruppe des Labors bereits in früheren Forschungsarbeiten durchgeführt [179]. Aufgrund des zeitlichen und finanziellen Aufwandes des genutzten Analyseverfahrens ist eine erneute Untersuchung des LRE für die vorliegende Arbeit nicht möglich, die Ergebnisse der Rohextraktanalyse werden aus der Forschungsgruppe übernommen [179]. Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, werden dieselben Pflanzenmaterialien (Samen aus dem Leinsamen *Linum usitatissimum*, Sorte „Barbara“ aus der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt MV, Rostock) mittels desselben Extraktionsverfahrens (Verfahren zur Lignanisolierung nach Luyengi und Kinghorn [106]) unter denselben Extraktionsbedingungen (Rohextrakterstellung mittels derselben Laborgerätschaften unter denselben Laborbedingungen) bearbeitet.

Die Durchführung der Extraktanalyse erfolgt mittels HPLC-MS. Im Ionisator des Massenspektrometers (LC-MS-System LCQ-Advantage: Thermo-Finnigan) werden die vorhandenen Verbindungen im Hochspannungsfeld bei +5 KW im ESI-Modus ionisiert. Die Molekulationen werden im Anschluss bei 150 °C über eine Transferkapillare geleitet, wo eine Auftrennung nach dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis erfolgt. Durch verschiedene Reaktion im atmosphärischen Teil ist ebenfalls eine Bildung von Addukten, speziell mit Natriumionen und Acetationen, möglich [179].

Im Registriersystem des Massenspektrometers erfolgt eine Identifizierung durch eine Korrelation der Molaren Masse der Strukturelemente mit der Molaren Masse bekannter Strukturen. Hierzu werden die Molaren Massen einer Auswahl häufig vorkommender Phytoestrogene genutzt (Tab. 2).

**Tab. 2:** Molare Massen der für die Analyse elektierten häufig vorkommenden Phytoestrogene in [g/mol] [181]

Verbindung	Molmasse	Dimer	Addukt	Glycosid	Diglycosid	Glycosid-Dimer
<b>Genistein</b>	270,2	540,4	330,2	432,4	594,6	864,4
<b>Daidzein</b>	254,2	508,4	314,2	416,4	578,6	832,8
<b>Formononetin</b>	268,2	536,4	328,2	430,4	592,6	860,8
<b>Boichanin A</b>	284,2	568,4	344,4	446,4	608,6	892,8
<b>Coumestrol</b>	268,2	536,4	328,2	430,4	592,6	860,8
<b>Secoisolariciresinol</b>	362,4	724,8	422,4	524,6	686,8	1049,2
<b>Matairesinol</b>	358,39	716,8	418,4	520,6	682,8	1041,2
<b>Enterodiol</b>	302,3	604,6	362,3	464,5	627,7	929
<b>Enterolacton</b>	298,3	596,6	358,3	460,5	622,7	921
<b>Pinoresinol</b>	374,43	748,8	434,4	536,6	698,8	1073,2
<b>Isolariciresinol</b>	360,4	722,8	420,4	522,6	684,8	1045,2
<b>Arctigenin</b>	372,4	744,8	432,4	534,6	696,8	1069,2
<b>Lariciresinol</b>	360,4	720,8	420,4	522,6	684,8	1045,2

In der HPLC-MS kann lediglich der qualitative Nachweis der Extraktinhaltsstoffe geführt werden. Eine Quantifizierung der gefundenen Substanzen ist im Rahmen der Arbeit der Forschungsgruppe nicht möglich. Hierzu wären zur Erstellung einer validierten Kalibrierungskurve Referenzstandards mit einer Reinheit von 99,99% notwendig, welche aus finanziellen Gründen nicht verfügbar sind [179].

#### 2.2.4.2 Die Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie des Kürbiskernrohextraktes

Für die Rohextraktanalyse mittels Py-FIMS werden zwischen 0,2 und 1,5 mg Probenmaterial verwendet. Das Material wird in einen Quarztiegel eingewogen, welcher in den Mikroheizer einer Probenschubstange überführt und in eine Ionenquelle transferiert wird. Bei einer Heizrate von 6,66 K je Scan erfolgt hier im Vakuum eine Aufspaltung der im Probenmaterial enthaltenen Biomakromoleküle in seine chemischen Untereinheiten. Die molekularen Bruchstücke aus dem thermischen Abbau werden in einem elektrischen Feld ionisiert. Die gasförmigen Moleküle werden im Finnigan MAT 900 Massenspektrometer beschleunigt, getrennt und elektrisch verstärkt. Anschließend erfolgt eine Detektion primärer thermischer Bruchstücke der Probe, welche sich mit der Struktur der zu untersuchenden Substanz korrelieren lassen.

Während der Aufheizphase von 110 bis 700 °C werden 91 einzelne Massenspektren aufgenommen und im Datensystem gespeichert. Die Vorteile der Py-FIMS liegen in den kurzen Reaktionszeiten, dem Bedarf an lediglich kleinen Materialmengen sowie der schonenden Ionisierung der verflüchtigten Moleküle im sehr hohen elektrischen Feld (FI Emitter + 4,8 kV, Gegenelektrode -5,5 kV) [182].

## 2.2.4 Die Zellaussaat für die Expositionsuntersuchungen

Die Zellen werden analog 2.2.1 von der Kulturflasche gelöst und analog 2.2.2 in ihrer Zelldichte bestimmt. Im Anschluss wird rechnerisch die notwendige Verdünnung zum Erreichen der gewünschten Zelldichte auf der Mikrotiterplatte ermittelt.

Die Zellen werden in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen / ml auf eine 96-well-Kulturplatte ausgesät, das Volumen je well beträgt 90  $\mu$ l. Aufgrund niedriger Messwerte muss die Zellzahl für die Zelllinie T47D auf  $1 \times 10^6$  Zellen / ml erhöht werden. Diese Versuchsreihen sind in den Diagrammen des Ergebnisteiles entsprechend gekennzeichnet.

Hinzugefügt werden die Extraktverdünnung des LRE bzw. KRE (10  $\mu$ l / well, in gewünschter Konzentration), das 17- $\beta$ -Estradiol-Lysat als Positivkontrolle (10  $\mu$ l, Endkonzentration im well entspricht  $10^{-9}$  molar), die Zellen in unbeeinflusstem Tumorwachstum (Zellen in Medium) als Negativkontrolle 1, sowie die Verdünnungslösungen als Leerproben.

Als Negativkontrolle 2 fungieren die Tumorzellen in Medium unter Zusatz der für Estradiol-Lysat und Rohextraktverdünnungen verwendeten Lösungsmittel (PBS, Ethanol 1,25 %). Eine Einschränkung der Proliferationsrate der Negativkontrolle 2 im Vergleich zur Negativkontrolle 1 wird in vier voneinander unabhängigen Versuchsreihen zu je vier Ansätzen ausgeschlossen.

Die Inkubation der Mikrotiterplatten erfolgt für die Expositionszeit von 48 h unter humidifizierten Bedingungen.

## Lösungen und Zubereitungen

### Die Verdünnungsreihe des 17- $\beta$ -Estradiol-Lysates

Stammpulver:	10 mg mit $M = 272,4$ g/mol
Erstverdünnung:	2,724 mg 17- $\beta$ -Estradiol in 10 ml Ethanol und 90 ml PBS
	$n = 100$ $\mu$ mol, entspricht $10^{-4}$ molar
Endkonzentrationen (im well):	1 nmol, entspricht $10^{-9}$ molar.

### Die Verdünnungsreihe des Leinsamenrohextraktes

Leinsamenrohextrakt:	$m = 138,1$ mg
Stammlösung:	10 mg Leinsamenrohextrakt + 250 $\mu$ l Ethanol + 750 $\mu$ l PBS
Endkonzentrationen (im well):	500 $\mu$ g/ml 300 $\mu$ g/ml 150 $\mu$ g/ml 100 $\mu$ g/ml 50 $\mu$ g/ml 10 $\mu$ g/ml 5 $\mu$ g/ml 1 $\mu$ g/ml 0,5 $\mu$ g/ml 0,1 $\mu$ g/ml 0,05 $\mu$ g/ml 0,01 $\mu$ g/ml 0,005 $\mu$ g/ml

## Die Verdünnungsreihe des Kürbiskernrohextraktes

Kürbiskernrohextrakt:	m = 53 mg
Stammlösung:	10 mg Kürbissamenrohextrakt + 250 µl Ethanol + 750 µl PBS
Endkonzentrationen (im well):	500 µg/ml 100 µg/ml 50 µg/ml 10 µg/ml 5 µg/ml 1 µg/ml 0,5 µg/ml 0,1 µg/ml

Die maximale Ethanolkonzentration beträgt 1,25 %. In der Literatur wird eine Ethanolkonzentration unter 2 % (bzw. unter 2,5 %) als nicht zytotoxisch eingestuft [138, 88]. Der Zytotoxizitätstest der vorliegenden Studie weist unter der maximal eingesetzten Ethanolkonzentration keine Einschränkung der Zellvitalität nach.

### 2.2.5 Die Bioassays

Als eine der effektivsten modernen Methoden werden Zellproliferationsassays im Mikrotiterplatten-Format eingesetzt. Durch die Arbeit im Miniaturformat können mehrere Testansätze schnell und simultan analysiert werden. Des Weiteren bedarf es hierdurch nur einem Minimalverbrauch an Zellen, Zellkulturmedien und Verbrauchsmaterialien. Die Testansätze können direkt auf der Mikrotiterplatte im ELISA-Messgerät mit einem hohen Grad an Präzision gemessen werden [120].

Die Kombination mehrerer *in-vitro* Testsysteme ist notwendig, um eine valide Aussage der Wirkeffekte zu erzielen. Jedoch schließen *in-vitro* Assays weder die Wirkung von Metaboliten noch Aspekte der Absorption der Verbindungen im menschlichen bzw. tierischen Organismus ein. Die Übertragbarkeit auf *in-vivo* ist beeinträchtigt [122].

#### 2.2.5.1 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein nicht-radioaktives, spectrophotometrisches Testverfahren, das zur Quantifizierung von Zellproliferation und Zellaktivität einer Zelllinie eingesetzt wird. Das Tetrazoliumsalz wird hierbei im Testverlauf in den Mitochondrien durch ein Enzym der Atmungskette, der Succinat-Dehydrogenase, in Formazankristalle umgesetzt [45]. Diese Umwandlung geschieht in Abhängigkeit der zellulären ATP-Produktion und stellt einen Parameter der metabolischen Zellaktivität dar. Folglich werden ausschließlich vitale Zellen detektiert. Das Signal im ELISA-Reader entsteht in Abhängigkeit der gebildeten Menge an Formazankristallen und korreliert mit dem Grad der Zellaktivität in der Zellkultur [45, 120]. Die Vorteile dieses colorimetrischen Testes bestehen in seiner Schnelligkeit und Genauigkeit. Zudem wird auf den Einsatz radioaktiver Substanzen verzichtet [120].



## Durchführung

Die Zellaussaat auf der Mikrotiterplatte erfolgt analog 2.2.1.

Die Testdurchführung beginnt nach 48-stündiger Exposition mit dem LRE in den Konzentrationen 0,005 bis 500 µg/ml bzw. dem KRE in den Konzentrationen 0,1 bis 500 µg/ml. Die benötigten Testreagenzien werden nach Herstellerangaben angesetzt.

Ein Volumen von 10 µl des MTT Labeling Reagenz wird pro well der Mikrotiterplatte zugeführt und für einen Zeitraum von 4 h bei 37 °C und 5 %igem CO<sub>2</sub>-Gehalt in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Die während dieser Zeit gebildeten Formazankristalle werden durch Zugabe von 100 µl Solubilization Lösung je well und Inkubation über Nacht bei humidifizierten Bedingungen lysiert. Die Messung der Extinction erfolgt am Folgetag im Multiwell-ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm mit einer Referenz von >650 nm.

Für jede Zelllinie erfolgen drei voneinander unabhängige Versuchsreihen zu je vier Ansätzen.

### 2.2.5.2 BrdU-Test

Der BrdU-Test stellt ein sensitives nicht-radioaktives Testverfahren dar, welches die DNA-Syntheserate in Zellkulturen ermittelt [68]. Das Testprinzip des BrdU-Testes beruht auf der Inkorporation von 5-Bromo-2'-deoxy-Uridine (BrdU) anstelle von Thymidin in die DNA während der DNA-Neusynthese in der S-Phase. Die DNA-Synthese wird dabei als direkter Parameter des Zellwachstums betrachtet.

## Durchführung

Die Zellaussaat auf der Mikrotiterplatte erfolgt analog 2.2.1. Nach 48-stündiger Exposition mit dem LRE in den Konzentrationen 0,005 bis 500 µg/ml bzw. dem KRE in den Konzentrationen 0,1 bis 500 µg/ml wird der BrdU-Test durchgeführt.

Die BrdU-Substratlösungen werden nach Herstellervorschrift angefertigt. Im ersten Arbeitsschritt erfolgt die Zugabe von je 10 µl BrdU-Labeling-Lösung / well. Anschließend wird die Kulturplatte bei 37 °C und 5 %igem CO<sub>2</sub>-Gehalt in wasserdampfgesättigter Atmosphäre für die Dauer von 3 h inkubiert. Der Überstand im well wird daraufhin verworfen, die Mikrotiterplatte wird zweimal mit 250 µl / well Waschmedium gespült. Es folgt die Trocknung der Platte für 30 min bei 60 °C. Nach dem Trocknungsvorgang werden 200 µl / well der Fixationslösung hinzupipettiert und für weitere 30 min bei -20 °C inkubiert. Die Fixationslösung wird daraufhin verworfen, die Mikrotiterplatte wird im Anschluss dreimal mit 250 µl Waschmedium / well erneut gespült.

Danach wird die Nuklease-Arbeitslösung (100 µl / well) aufgetragen und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wird verworfen, es schließt sich ein dreimaliger Waschvorgang an. Nun werden 100 µl der Anti-BrdU-Peroxidase / well hinzugegeben und die Kulturplatte für 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wird erneut verworfen. Die Mikrotiterplatte wird daraufhin dreimal mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer gewaschen.

Im Anschluss erfolgt die Zugabe von je well 100 µl Peroxidase-Substrat. Diesem ist zur Verstärkung des Extinctionssignals ein Substratverstärker nach Herstellervorschrift zugesetzt. Die Messung der Extinction erfolgt mit einem Multiwell-ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenz von 490 nm. Für jede Zelllinie erfolgen drei voneinander unabhängige Versuchsreihen zu je vier Ansätzen.

### 2.2.5.3 Zytotoxizitätstest

Durch den Zytotoxizitätstest soll ermittelt werden, ob eine Lösung oder ein Extrakt ab einer bestimmten Konzentration zellschädigend wirkt und damit die Ergebnisse beeinflussen kann. Folgende Messskala kommt hierbei zum Einsatz (Tab. 3).

**Tab. 3:** Zytotoxizitätskala.

0	Akzeptanz	Das Material ist nicht zytotoxisch
1	Leichte Hemmung	Das Material ist schwach toxisch
2	Deutliche Hemmung	Das Material ist mäßig toxisch
3	Toxizität	Das Material ist stark toxisch

Zur Beurteilung der Zytotoxizität kommt der Trypanblau-Färbetest zur Anwendung [142]. Mit dieser Methode kann das Verhältnis von vitalen zu avitalen Zellen nach LRE-, KRE- sowie Lösungsmittelsexposition ermittelt und dem unbeeinflussten Tumorstadium gegenübergestellt werden.

Der prozentuale Anteil der vitalen Zellen wird als Zellvitalität bezeichnet. Wird eine Einschränkung der Zellvitalität mit ansteigender Rohextraktkonzentration festgestellt, kann die  $IC_{50}$  ermittelt werden. Die  $IC_{50}$  entspricht dabei jener Konzentration eines Hemmstoffes, welcher eine Zelle oder einen Zellrezeptor *in-vitro* zu 50 % im Vergleich zur Negativkontrolle blockiert [185].

### Durchführung

Die Zellaussaat auf der Mikrotiterplatte erfolgt analog 2.2.1. Sie wird parallel zu den für den MTT- bzw. BrdU-Test angesetzten Mikrotiterplatten mitgeführt.

Nach 48-stündiger LRE- bzw. KRE-Exposition werden die Zellen mechanisch mittels einer Pipettenspitze von der Wand der Wells gelöst, ein Volumen von 90 µl Zellsuspension wird in eine Eppendorftube pipettiert. Diese wird mit 10 µl Trypanblau-Lösung versetzt. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran färben sich dabei nicht an, avitale Zellen mit geschädigter Zellmembran nehmen dagegen den Farbstoff auf und lassen sich blau angefärbt darstellen. Unter dem Mikroskop wird in einer Bürker-Zählkammer die Anzahl der vitalen und avitalen Zellen ausgezählt. Der prozentuale Anteil vitaler Zellen in Bezug auf die Gesamtzellzahl entspricht der Zellvitalität. Eine Substanz gilt als zytotoxisch, wenn sie (in ansteigender Konzentration) die Zellvitalität im Vergleich zur Negativkontrolle herabsetzt.

### 2.2.6 Statistik

Zur Beurteilung der wissenschaftlichen Aussagefähigkeit der Testergebnisse wird der U-Test nach Mann-Whitney eingesetzt. Es handelt sich hierbei um ein statistisches Testverfahren für zwei unabhängige Stichproben bei nicht gegebener Normalverteilung oder bei kleineren Stichprobenzahlen [91]. Ermittelt wird die Signifikanz des Ergebnisses. Diese lässt eine Aussage darüber zu, ob das Ergebnis der Stichprobe durch den Zufall erklärbar ist oder auf eine Grundgesamtheit übertragen werden kann. Ein Ergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wird als signifikant (\*) bezeichnet (Tab. 4). Ein Ergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,1$  gilt als tendenziell signifikant (t(\*)).

**Tab. 4:** Gebräuchliche Signifikanzniveaus [91].

Irrtums- wahrscheinlichkeit <b>p</b>	$\geq 0,05$	$< 0,05$	$< 0,01$	$< 0,001$
Bedeutung	Nicht signifikant	Signifikant	Sehr signifikant	Hoch signifikant
Symbol	Ns	*	**	***

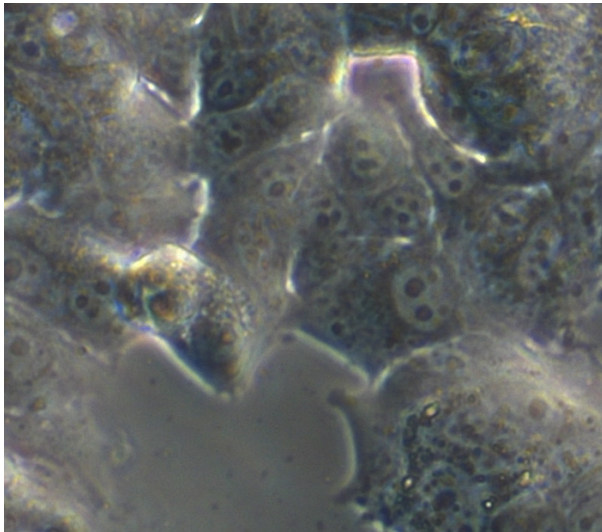
Für die statistischen Berechnungen verwenden wir die Software SPSS für Windows, Version 11.05.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Die Ergebnisse der Zellkultivierungen

##### 3.1.1 Kultivierung der Zelllinie MCF-7

Das Wachstumsverhalten der Mammacarcinomzellen der Zelllinie MCF-7 ist anfänglich durch eine Zellkoloniebildung aus abgerundeten Zellen gekennzeichnet. Im Verlauf weniger Tage entwickelt sich ein flächiges epithelartiges Zellwachstum im Monolayer (Abb. 8).

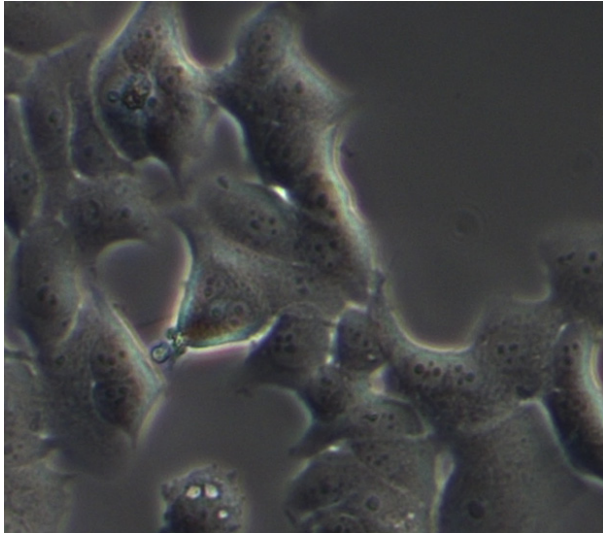


**Abb. 8:** Mikroskopisches Zellwachstum der Zelllinie MCF-7. Vergrößerung: 20-fach.

MCF-7 zeigt ein rasches Wachstum, die Zellverbände treten dabei frühzeitig miteinander in Kontakt. Ein 80 %ig konfluenter Zellrasen wird durchschnittlich innerhalb von vier bis sechs Tagen erreicht.

##### 3.1.2 Kultivierung der Zelllinie T47D

Die Mammacarcinomzelllinie T47D zeichnet sich durch ein äußerst rasches Zellwachstum aus. Ähnlich der Zelllinie MCF-7 wachsen die Carcinomzellen der Zelllinie T47D flächig und epithelartig im Monolayer (Abb. 9).

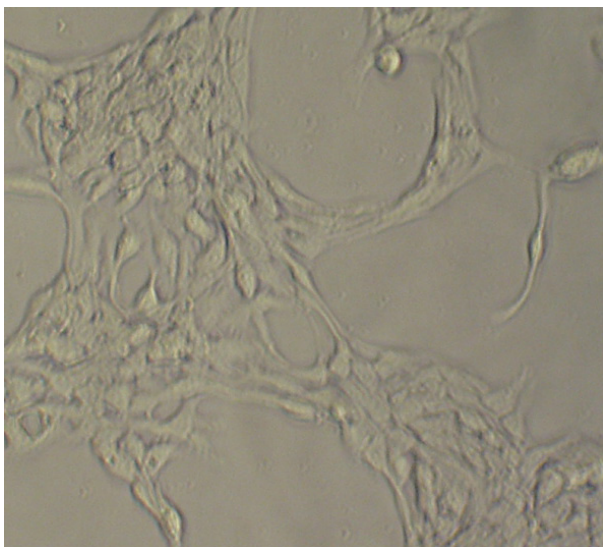


**Abb. 9:** Mikroskopisches Zellwachstum der Zelllinie T47D. Vergrößerung: 20-fach.

Eine Kommunikation zwischen den einzelnen Zellkolonien läßt sich bereits am 2. Tag nach Aussaat erkennen. Eine 80 %ige Konfluenz des Zellrasens zeigt sich im Durchschnitt am 5. Tag der Kultivierung.

### 3.1.3 Kultivierung der Zelllinie HCC-70

Nach Aussaat in die Kulturflasche sind die Zellen der Mammacarcinomzelllinie HCC-70 durch ein anfänglich stark verzögertes Wachstum geprägt. Die Zellen bilden initial kleine, nach außen abgerundete Zellkolonien aus, unter welchen kein äußerlich erkennbarer Kontakt besteht. Nach fünf bis sieben Tagen verändert sich das Wachstumsbild. Die Zellen bilden nun eine sich in die Länge ausdehnende Zellform, die Zellverbände konfluieren. Auf diese Weise bildet HCC-70 innerhalb weniger Tage einen netzförmigen einschichtigen Zellrasen aus (Abb. 10).

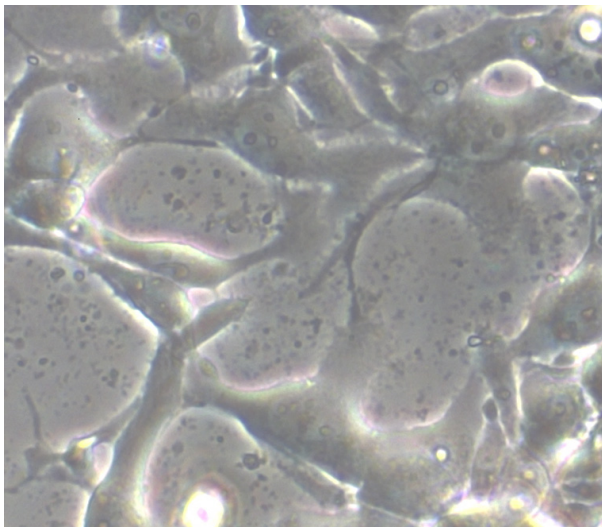


**Abb.10:** Mikroskopisches Zellwachstum der Zelllinie HCC-70. Vergrößerung: 20-fach.

Der Zellrasen wird bei etwa 80 %iger Konfluenz von der Kulturflasche abgelöst und dem Experiment zugeführt.

### **3.1.4 Kultivierung der Mammacarcinomzelllinie BT20**

Die Mammacarcinomzelllinie BT20 zeigt in den ersten Tagen nach Aussaat ein sehr langsames Zellwachstum in kleinen nach außen abgerundeten Zellverbänden. Nach vier bis sechs Tagen nehmen die Zellen eine stark in die Länge gezogene Zellform an (Abb. 11). Die Zellverbände wachsen nun rasch.



**Abb. 11:** Mikroskopisches Zellwachstum der Zelllinie BT20. Vergrößerung: 20-fach.

Innerhalb weniger Tage bildet BT20 auf diese Weise einen 80 %ig konfluenten Zellrasen im Monolayer aus.

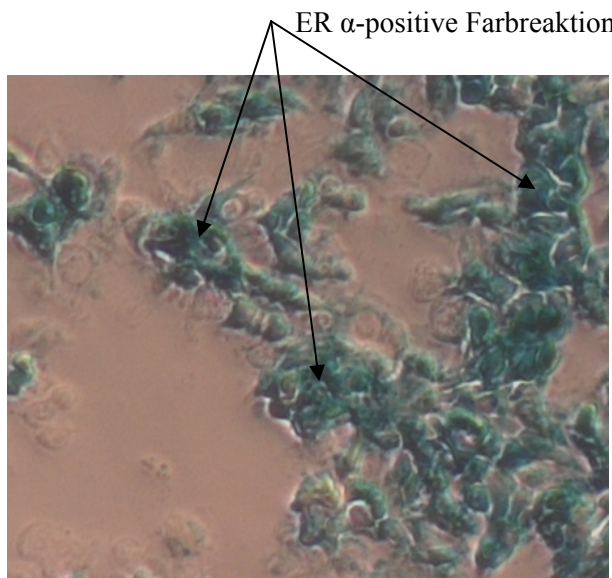


### 3.2 Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung

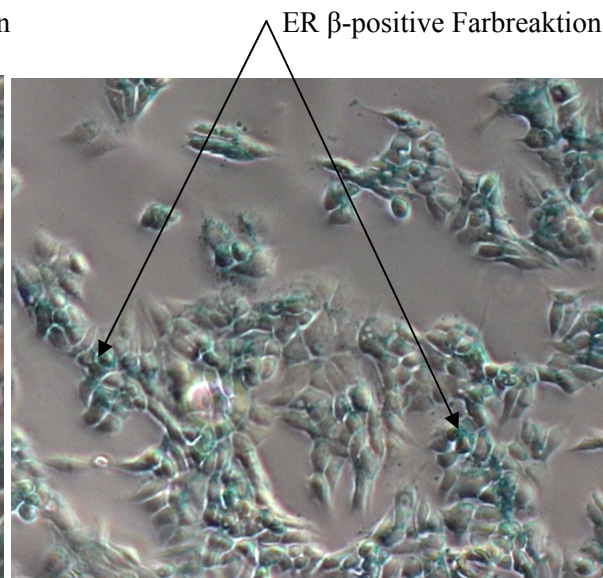
#### 3.2.1 Rezeptorstatus der Zelllinie MCF-7

##### Reaktionssubstrat: Histogreen

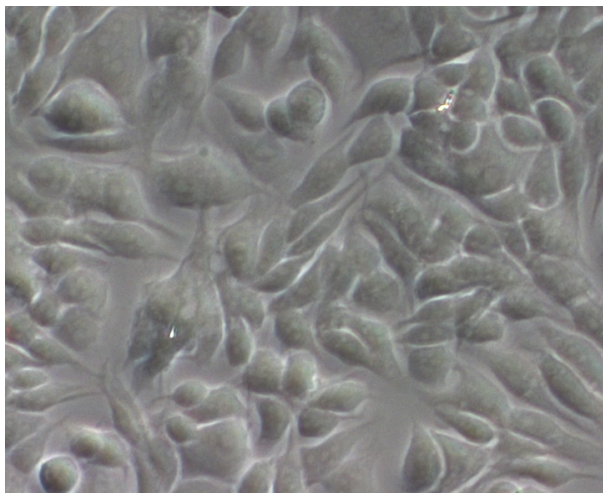
Der Estrogenrezeptorstatus für den ER  $\alpha$  der Zelllinie MCF-7 wird in den immunhistochemischen Untersuchungen stark positiv visualisiert (+++) (Abb. 12). Ebenso resultiert aus dem Test auf den ER  $\beta$  ein positives Ergebnis (++) (Abb. 13). Die Negativkontrolle bleibt ohne Farbreaktion (Abb. 14).



**Abb. 12:** Status des Estrogenrezeptors  $\alpha$  der Zelllinie MCF-7. Vergrößerung: 10-fach.



**Abb. 13:** Status des Estrogenrezeptors  $\beta$  der Zelllinie MCF-7. Vergrößerung: 10-fach.

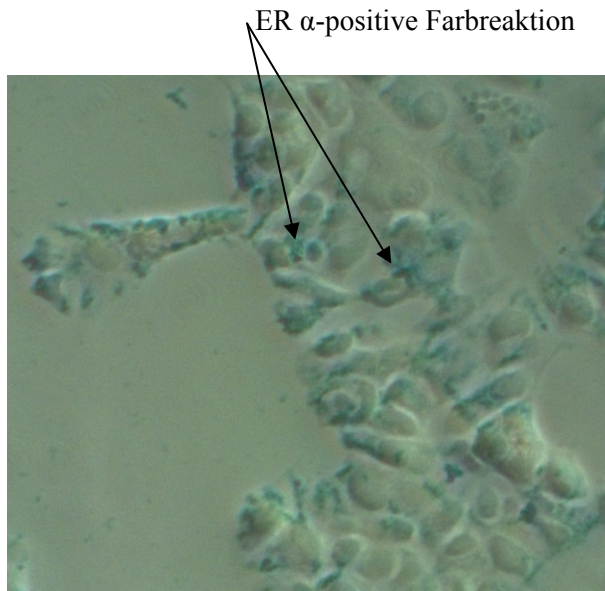


**Abb. 14:** Negativkontrolle der Immunhistochemie der Zelllinie MCF-7. Vergrößerung: 20-fach.

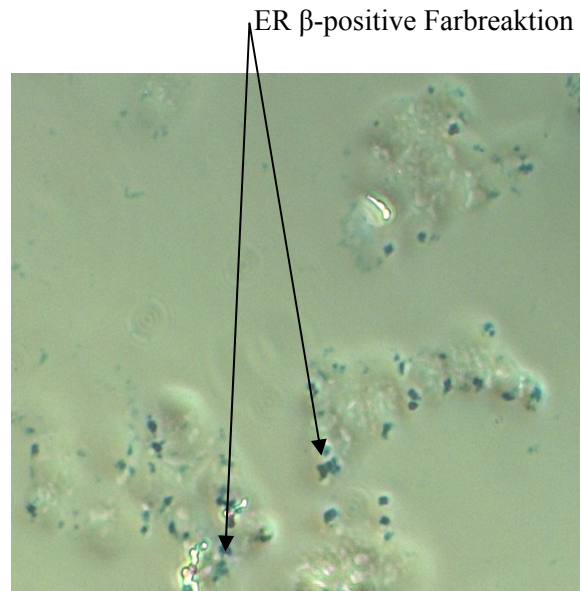
### 3.2.2 Rezeptorstatus der Zelllinie T47D

Reaktionssubstrat: Histogreen

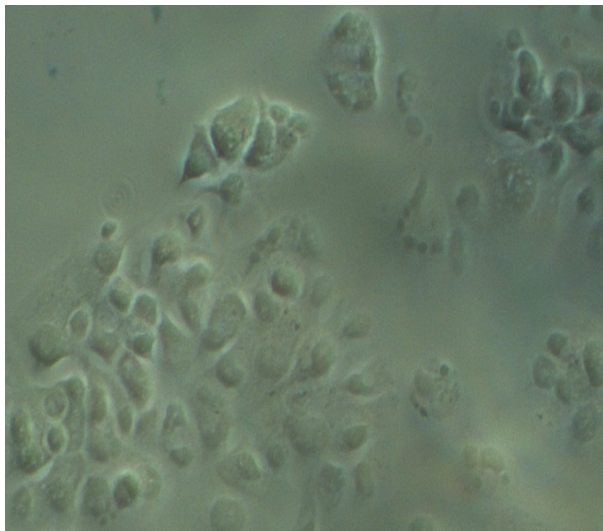
Für T47D wird der ER  $\alpha$  in der Immunhistochemie zweifach positiv (++) detektiert (Abb. 15). Einfach positiv ist der Estrogenrezeptorstatus für den ER  $\beta$  (+) (Abb. 16). Die Negativkontrolle bestätigt das Fehlen von unspezifischen Hintergrundreaktionen (Abb. 17).



**Abb. 15:** Status des Estrogenrezeptors  $\alpha$  der Zelllinie T47D. Vergrößerung: 10-fach.



**Abb. 16:** Status des Estrogenrezeptors  $\beta$  der Zelllinie T47D. Vergrößerung: 10-fach.



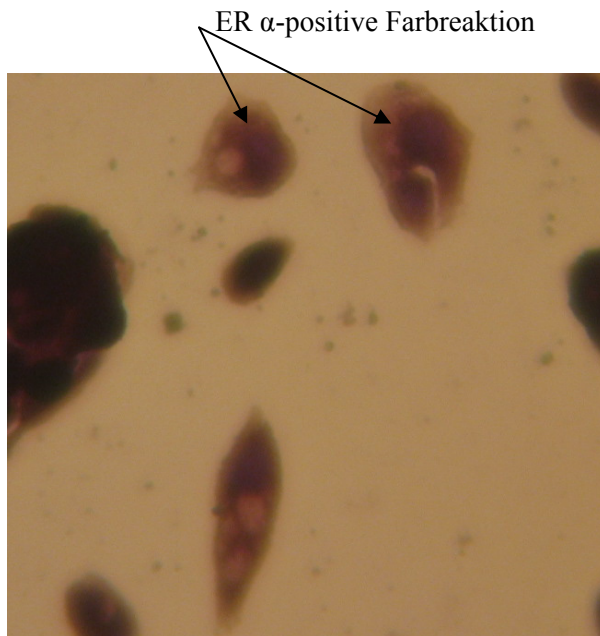
**Abb. 17:** Negativkontrolle der Immunhistochemie der Zelllinie T47D. Vergrößerung: 10-fach.



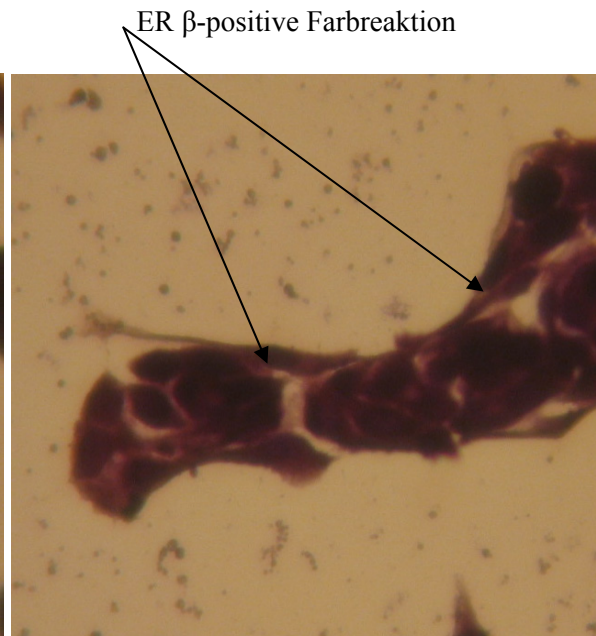
### 3.2.3 Rezeptorstatus der Zelllinie HCC-70

Reaktionssubstrat: Diaminobenzidin

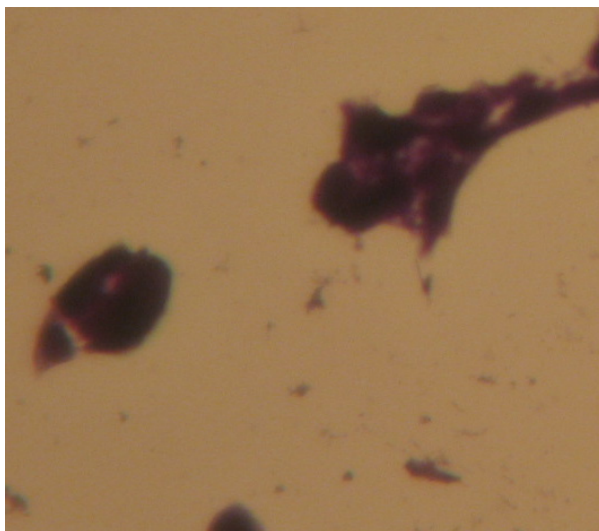
In der immunhistochemischen Untersuchung wird für HCC-70 die Expressierung des ER  $\alpha$  zweifach positiv visualisiert (++) (Abb. 18). ER  $\beta$  wird schwach positiv detektiert ((+)) (Abb. 19). Unspezifische Hintergrundreaktionen können in der Negativkontrolle ausgeschlossen werden (Abb. 20).



**Abb. 18:** Status des Estrogenrezeptors  $\alpha$  der Zelllinie HCC-70. Vergrößerung:40-fach.



**Abb. 19:** Status des Estrogenrezeptors  $\beta$  der Zelllinie HCC-70. Vergrößerung:40-fach.

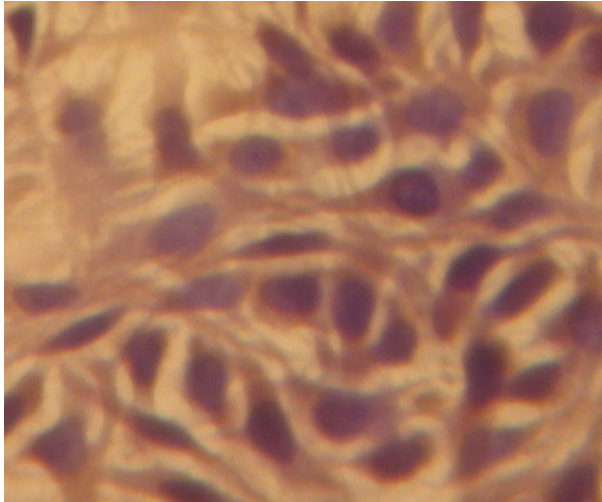


**Abb. 20:** Negativkontrolle der Immunhistochemie der Zelllinie HCC-70. Vergrößerung: 40-fach.

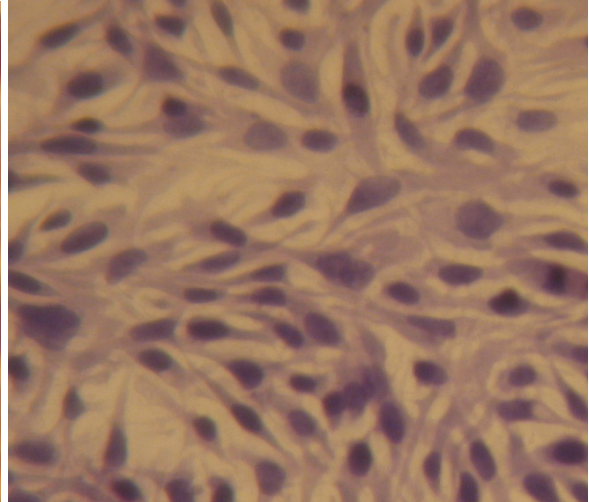
### 3.2.4 Rezeptorstatus der Mammacarcinomzelllinie BT20

Reaktionssubstrat: Diaminobenzidin

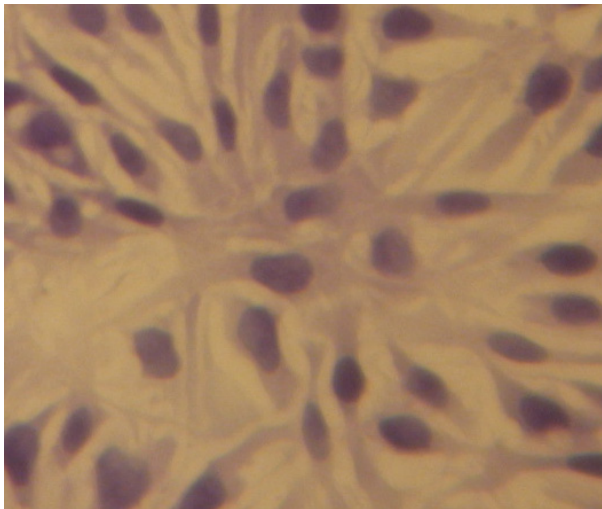
Die immunologischen Untersuchungen hinsichtlich der Expressierung der ER  $\alpha$  und  $\beta$  zeigen für die Zelllinie BT20 ein negatives Ergebnis (-) (Abb. 21 und 22). Die Negativkontrolle bleibt ohne Farbreaktion (Abb. 23).



**Abb. 21:** Status des Estrogenrezeptors  $\alpha$  der Zelllinie BT20. Vergrößerung: 40-fach.



**Abb. 22:** Status des Estrogenrezeptors  $\beta$  der Zelllinie BT20. Vergrößerung: 40-fach.



**Abb. 23:** Negativkontrolle der Immunhistochemie der Zelllinie BT20. Vergrößerung: 40-fach.

### 3.3 Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Rohextrakte

#### 3.3.1 Ergebnisse der High Performance Liquid Chromatography-Massenspektrometrie des Leinsamenrohextraktes

Die nachfolgende Tabelle enthält eine Übersicht der mittels HPLC-MS detektierten Lignane und Isoflavone des LRE. Im Rahmen der Analyse können lediglich qualitative Aussagen getroffen werden (vgl. 2.2.4.1).

**Tab. 5:** Übersicht der mittels High Performance Liquid-Massenspektrometrie identifizierten Lignane und Isoflavone des Leinsamenrohextraktes [179].

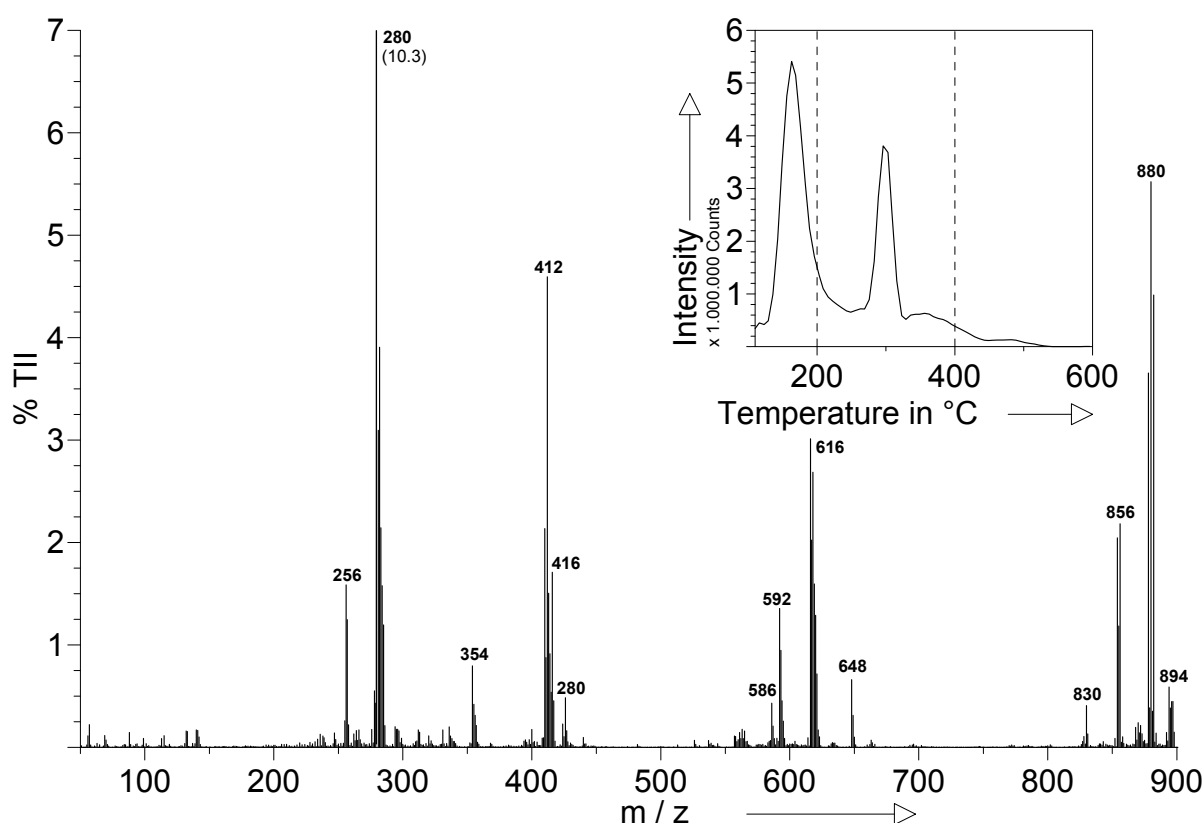
Detektierte Lignane	Masse pro Einheit in [g/mol]	Detektierte Isoflavone	Masse pro Einheit in [g/mol]
<b>Secoisolariciresinol</b>	362,4	<b>Genistein-Dimer</b>	540,4
<b>Secoisolariciresinol-Dimer</b>	724,8	<b>Genistein-Glycosid</b>	432,4
<b>Secoisolariciresinol-Glycosid-Dimer</b>	1049,2	<b>Genistein-Diglycosid</b>	594,6
<b>Arctigenin-Glycosid-Dimer</b>	1069,2	<b>Daidzein-Diglycosid</b>	578,6
<b>Pinoresinol-Addukt</b>	434,4	<b>Biochanin A-Glycosid</b>	446,4
<b>Pinoresinol-Glycosid-Dimer</b>	1073,2	<b>Biochanin A-Diglycosid</b>	608,6

Nach weiterer Fraktionierung des Pflanzenrohextraktes aus dem Leinsamen können zusätzlich die Lignane Matairesinol und Matairesinol-Addukt; Isolariciresinol-Addukt, Isolariciresinol-Glycosid-Dimer und Isolariciresinol-Diglycosid sowie Lariciresinol-Addukt und Lariciresinol-Glycosid-Dimer gefunden werden [179].

In der HPLC-MS des LRE zeigt sich ein sehr heterogenes Stoffgemisch. Neben den für die Analyse detektierten Lignanen und Isoflavonen muss von der Existenz einer Vielzahl weiterer Inhaltsstoffe ausgegangen werden.

### 3.3.2 Ergebnisse der Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie des Kürbiskernrohextraktes

Die folgende Abbildung (Abb. 24) zeigt das gemittelte und summierte Py-FI Massenspektrum des KRE. Dargestellt ist die Totalionenintensität (TII) in %, zugeordnet zu den Masse / Anzahl der Einheitsladungen ( $m/z$ )-Signalen der für die Analyse elektierten Substanzen (s.u.). Oben rechts in der Abb. befindet sich das Thermogramm der TII. Dieses illustriert den Zusammenhang zwischen Pyrolyse-Temperatur und detektierter TII (Angabe in counts je mg).



**Abb. 24:** Summiertes, gemitteltes Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrum und Thermogramm der Totalionenintensität (oben rechts) des Kürbiskernrohextraktes [182].  
TII: Totalionenintensität in %

Nachfolgende Tabelle zeigt eine Übersicht der mittels Py-FIMS detektierten Substanzen im Kürbiskernrohextrakt (Tab. 6).

**Tab. 6:** Mittels Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie detektierte Substanzen des KRE [182].

(1) Lignane (Secoisolariciresinol, Matairesinol, Arctigenin)

(2) Flavonoide (Genistein, Daidzein, Formononetin, Quercetin)

(1)+(2) Nachweis als Aglycon

(3) Zuordnung in diese Klasse, sofern nicht in CL07, CL09, CL10, CL15 enthalten

TII: Totalionenintensität in %

Verschlüsselung	Detektierte Substanz	% TII
CL01	Kohlenhydrate	0,3
CL02	Phenole und Lignin/Lignan-Monomere	0,2
CL03	Lignindimere	2,2
CL04	Lipide, Alkane, Alkene, Fettsäuren, n-Alkylester (3)	0,6
CL05	Alkylaromaten	0,8
CL06	N-haltige Verbindungen	0,5
CL07	Sterole und Triterpene	4,5
CL08	Peptide und Aminosäuren	0,8
CL09	Suberine	0,2
CL010	freie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (n-C <sub>16</sub> bis n-C <sub>34</sub> )	67,8
CL011	Niedermolekulare Verbindungen m/z 15 bis 56	1,2
CL012	Isotopen <sup>13</sup> C-Signale	0,0
CL013	Lignane (1)	0,1
CL014	Flavonoide (2)	0,5
CL015	Di- und Triglyceride	17,2
		96,8

Trotz einer Entfettung des Rohextraktes mittels Soxhletapparatur (vgl. 2.2.3.1) enthält der KRE in hohen Konzentrationen freie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (n-C<sub>16</sub> bis n-C<sub>34</sub>) sowie Di- und Triglyceride. Entsprechend werden die Spektren auch von diesen Substanzen dominiert.

Weiterhin ist es möglich, sofern nachweisbar, Lignane und Flavonoide über eine substanzklassenspezifische, Markersignal-basierte Datenbank zuzuordnen. Dazu werden aus der Klasse der Lignane Secoisolariciresinol, Matairesinol und Arctigenin ausgewählt. Repräsentativ für die Flavonoide werden Genistein, Daidzein, Formononetin und Quercetin elektiert. Nachweisbar im Extrakt sind die Markersignale von Secoisolariciresinol bei den Lignanenen und Quercetin bei den Flavonoiden. Eine Quantifizierung ist aufgrund der vergleichsweise niedrigen relativen TII (siehe Tab. 6) und des hohen Fettsäureanteils nicht möglich [182].

### 3.4 Statistik

Zur statistischen Auswertung verwenden wir die Software SPSS für Windows, Version 11.05. Für jede Viererwertbestimmung einer Rohextraktkonzentration und der Positivkontrolle erfolgt die Computeranalyse via Nichtparametrischer Tests für zwei unabhängige Stichproben nach dem Mann-Whitney-U-Test, mit Bezug zur Negativkontrolle 1. Der Testvariablen entspricht die Extraktkonzentration, der Gruppenvariablen als Gruppe 1 die Negativkontrolle 1, als Gruppe 2 die jeweilige LRE- bzw. KRE-Konzentration. Im Ergebnis zeigt sich eine Tabelle, welche im Folgenden beispielhaft abgebildet ist (Tab.7).

**Tab. 7:** Ergebnis des Mann-Whitney-U-Test bei zwei unabhängigen Stichproben [91].  
**Exakte Signifikanz [2\*(1-seitig Sig.)] 0,061(a):** Testrelevante Signifikanzangabe (im Bsp.: Ns.)

	Konzentration
Mann-Whitney-U-Test	130,000
Wilcoxon-W	320,000
Z	-1,887
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,059
<b>Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]</b>	<b>0,061(a)</b>

Aus der jeweiligen Tabelle kann die Signifikanz des Testergebnisses für die entsprechende Rohextraktkonzentration abgelesen werden (Signifikanzbeurteilung gemäß Tab. 4, vgl. 2.2.6). Betrachtet wird hierbei die exakte Irrtumswahrscheinlichkeit p (Exakte Signifikanz [2\*(1-seitig Sig.)], welche bei geringem Stichprobenumfang (weniger als 30 Werte) zum Einsatz kommt [91].

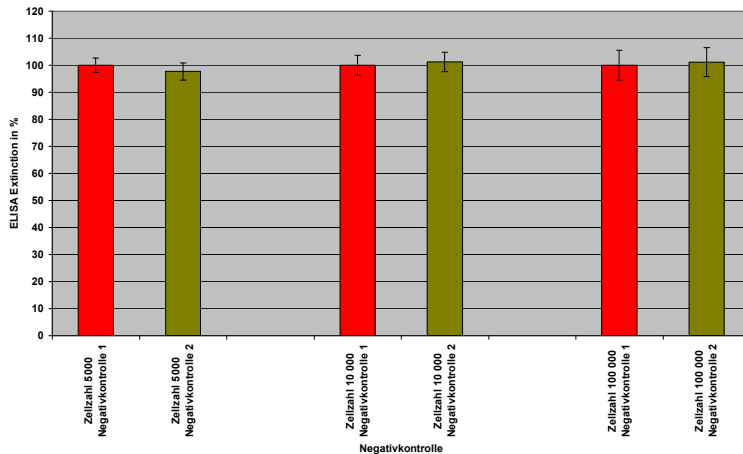
Eine Aufzeichnung aller statistisch signifikanten Werte erfolgt für jede Zelllinie in tabellarischer Übersicht zum Abschluss der MTT- bzw. BrdU- Ergebnisse.

### 3.5. Die Ergebnisse für die Testdurchläufe der Negativkontrollen 1 und 2

Im Testansatz werden zwei Negativkontrollen geführt. Negativkontrolle 1 entspricht dem unbeeinflussten Tumorwachstum der Zellen in Medium. Als Negativkontrolle 2 fungieren die Tumorzellen in Medium unter Zusatz der für das 17- $\beta$ -Estradiol-Lysat sowie die Rohextraktverdünnungen verwendeten Lösungsmittel (PBS, Ethanol 1,25 %).

Das Wachstumsverhalten der Negativkontrolle 1 wird im Vergleich zu jenem der Negativkontrolle 2 in vier voneinander unabhängigen Versuchsreihen zu je vier Ansätzen untersucht. Die Testreihen werden für verschiedene Zellzahlen (Zellzahl 5 000, 10 000, 100 000 und 1 000 000 / ml) und verschiedene Zelllinien (MCF-7, T47D) durchgeführt.

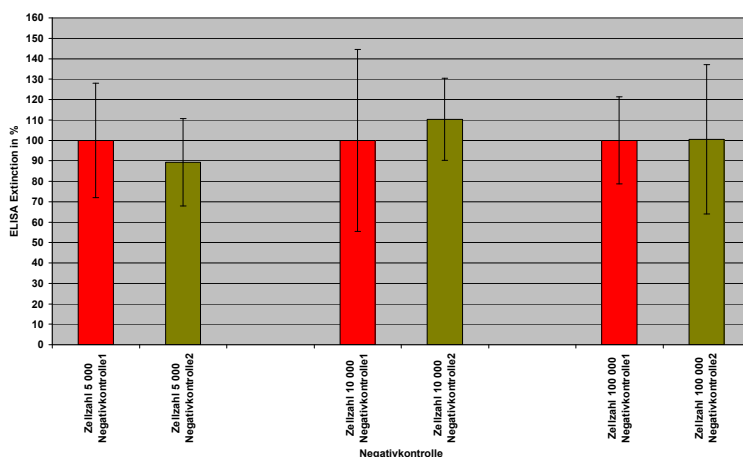
Die Diagramme 25 und 26 zeigen das Wachstumsverhalten der Negativkontrollen 1 und 2 im MTT- sowie BrdU-Test für die Zelllinie MCF-7 mit den Zellzahlen 5 000, 10 000 und 100 000 / ml. Die Zellzahl 100 000 entspricht der im Test verwendeten Zellzahl / ml.



**Abb. 25:** Vergleich der Negativkontrollen 1 und 2 für die Zelllinie MCF-7. Zellzahl 5 000, 10 000, 100 000. MTT-Test.

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Grün: Zellen+Medium+Zusätze: PBS, Ethanol 1,25 % (Negativkontrolle 2)



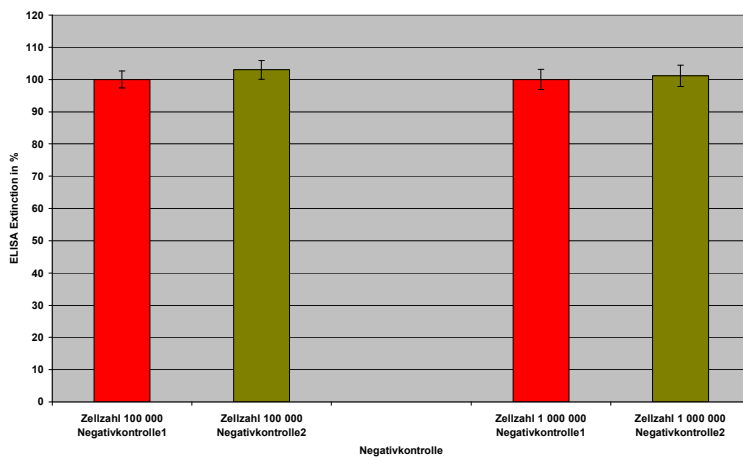
**Abb. 26** Vergleich der Negativkontrollen 1 und 2 für die Zelllinie MCF-7. Zellzahl 5 000, 10 000, 100 000. BrdU-Test.

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Grün: Zellen+Medium+Zusätze: PBS, Ethanol 1,25 % (Negativkontrolle 2)

Die Negativkontrollen 1 und 2 zeigen im MTT-Test vergleichbare Extinctionswerte (Negativkontrolle 2 erreicht 98-101 % der Negativkontrolle 1). Im BrdU-Test beobachten wir lediglich geringfügige Unterschiede der Extinctionswerte (Negativkontrolle 2 erreicht 89-110 % der Negativkontrolle 1), diese bleiben in der statistischen Auswertung ohne Signifikanz. In unseren Testreihen ist für die Zelllinie MCF-7 für keine der verwendeten Zellzahlen ein unterschiedliches Wachstumsverhalten der Negativkontrollen 1 und 2 nachzuweisen. Die Zusätze PBS und Ethanol (1,25 %) üben keinen inhibitorischen Einfluss auf die Tumorzellproliferation aus.

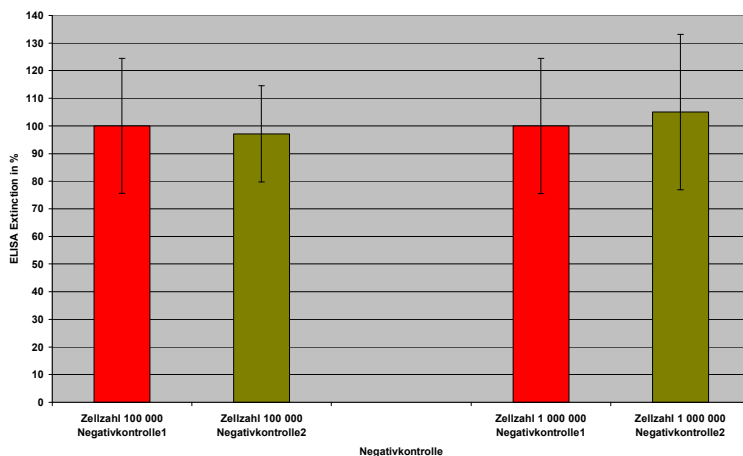
Abbildungen 27 und 28 stellen das Wachstumsverhalten der Negativkontrollen 1 und 2 im MTT- sowie BrdU-Test für die Zelllinie T47D dar. Zum Einsatz kommen die Zellzahlen 100 000 und 1 000 000 / ml; beide werden im Experiment verwendet.



**Abb. 27:** Vergleich der Negativkontrollen 1 und 2 für die Zelllinie T47D. Zellzahl 100 000, 1 000 000. MTT-Test.

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Grün: Zellen+Medium+Zusätze: PBS, Ethanol 1,25 % (Negativkontrolle 2)



**Abb. 28:** Vergleich der Negativkontrollen 1 und 2 für die Zelllinie T47D. Zellzahl 100 000, 1 000 000. BrdU-Test.

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Grün: Zellen+Medium+Zusätze: PBS, Ethanol 1,25 % (Negativkontrolle 2)

Im Vergleich des Wachstumsverhaltens der Negativkontrollen 1 und 2 beobachten wir für den MTT-Test vergleichbare Extinctionswerte (Extinction der Negativkontrolle 2 entspricht 101-103 % der Negativkontrolle 1). Im BrdU erreicht die Negativkontrolle 2 einen prozentualen Anteil von 97-100 % der Negativkontrolle 1.

Ein signifikant unterschiedliches Wachstumsverhalten der Negativkontrollen 1 und 2 kann auch hier nicht beobachtet werden. PBS und Ethanol (1,25 %) üben keinen wachstumshemmenden Einfluss auf die Tumorzellproliferation aus.



### **3.6 Die Ergebnisse der Bioassays für die Exposition mit dem Leinsamenrohextrakt**

#### **MTT- und BrdU-Test**

Die Testergebnisse der Bioassays für die Leinsamenrohextraktexpositionen werden nachfolgend graphisch im Säulendiagramm und in tabellarischer Übersicht dargestellt, statistisch signifikante Ergebnisse werden gekennzeichnet.

In den Diagrammen sind die Extinctionswerte als Maß der metabolischen Aktivität der Zellen (MTT-Test) bzw. der DNA-Neusyntheserate (BrdU-Test) in Bezug zur jeweils verwendeten LRE-Konzentration dargestellt. Gegenübergestellt finden sich links in jedem Diagramm die Extinctionswerte der Negativkontrolle 1. Mit 17- $\beta$ -Estradiol-Lysat in einer Konzentration von  $10^{-9}$  molar inkubierte Zellen, ebenfalls links im Diagramm dargestellt, fungieren als Positivkontrolle. Mit dem 17- $\beta$ -Estradiol-Lysat soll eine Tumorzellstimulation erreicht werden.

Die Angaben der Extinctionswerte werden in Prozent erstellt. Das Wachstum der unbeeinflussten Tumorzellen entspricht dabei 100 %. Die Konzentrationen des LRE werden in  $\mu\text{g/ml}$  definiert, die Konzentration der Positivkontrolle in molar.

Für jede Zelllinie erfolgen drei voneinander unabhängige Versuchsreihen zu je vier Ansätzen pro Konzentration. Aufgrund des Vorhandenseins verhältnismäßig weniger Werte (vier pro Konzentration) und Schwankungen innerhalb einer Viererwertbestimmung (im BrdU) wird anstelle eines Mittelwertes der Median ermittelt [91]. Jeweils der Median aus den vier Ansätzen der einzelnen Konzentrationen entspricht einer Säule im Diagramm.

#### **Zytotoxizitätstest**

Die dargestellten Diagramme zeigen eine Gegenüberstellung der vitalen und avitalen Zellen nach Exposition mit den LRE-Konzentrationen 0,005 bis 500  $\mu\text{g/ml}$  für alle verwendeten Zelllinien. Links im Diagramm erscheinen die Negativkontrolle 1 sowie die Positivkontrolle. Rechts ist der Anteil vitaler Zellen für die einzelnen LRE-Konzentrationen dargestellt.

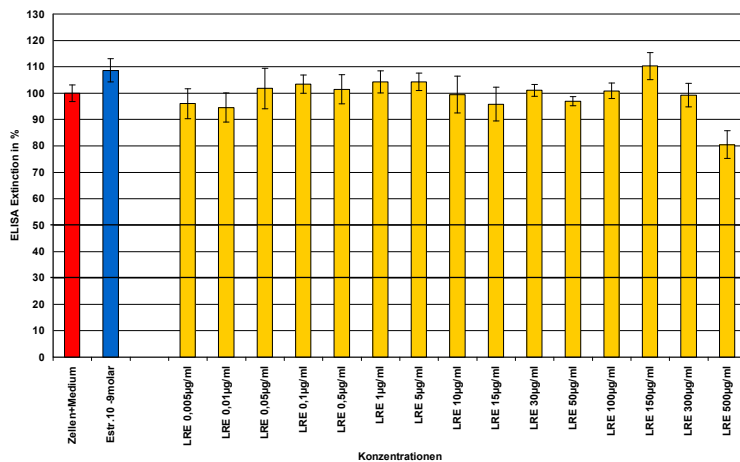
Die Angaben der vitalen und avitalen Zellen erfolgen in Prozent. Hierbei entspricht die Summe aller beobachteten Zellen 100 %. Die Beurteilung des prozentualen Anteils vitaler Zellen unter LRE-Exposition erfolgt im Vergleich zur Zellvitalität der Negativkontrolle 1.

#### **3.6.1 Ergebnisse der Zelllinie MCF - 7**

Die Expositionsuntersuchungen der ER-positiven Mammacarcinomzelllinie MCF-7 im MTT- sowie BrdU-Test zeigen Abb. 29-34. Die eingesetzte Zellzahl beträgt 100 000 / ml.

\* bezeichnet die Signifikanz eines Ergebnisses, t(\*) die tendenzielle Signifikanz. Ns kennzeichnet die nicht signifikanten Ergebnisse.

## MTT-Test



**Abb. 29:** Diagramm des MTT-Tests 1 der Zelllinie MCF-7 unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Gelb: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (500 µg/ml): bis 81 %.

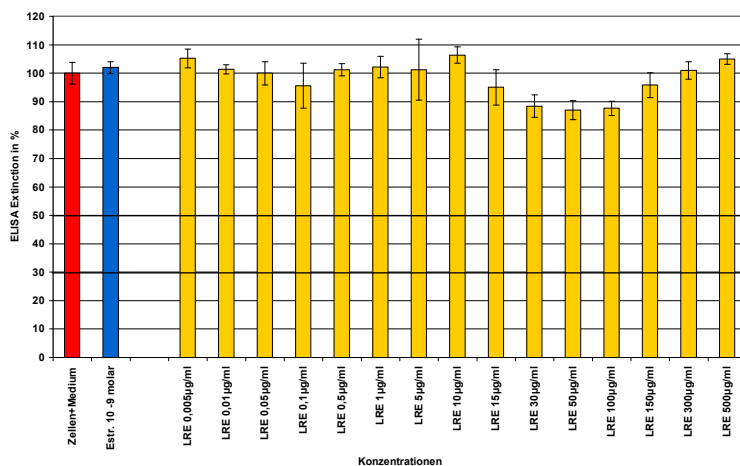
Mittlere Konzentrationen (50 µg/ml): bis 97 %.

Wachstumsstimulation

\* und t(\*): 150 µg/ml: auf 110 %.

17-β Estradiol-Lysat: Wachstumsstimulation: auf 109 %, t(\*).

Die weiteren Extinctionswerte für die Expositionen der LRE-Konzentrationen schwanken eng um 100 % (Zellwachstumsrate der Negativkontrolle 1).



**Abb. 30:** Diagramm des MTT-Tests 2 der Zelllinie MCF-7 unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Gelb: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

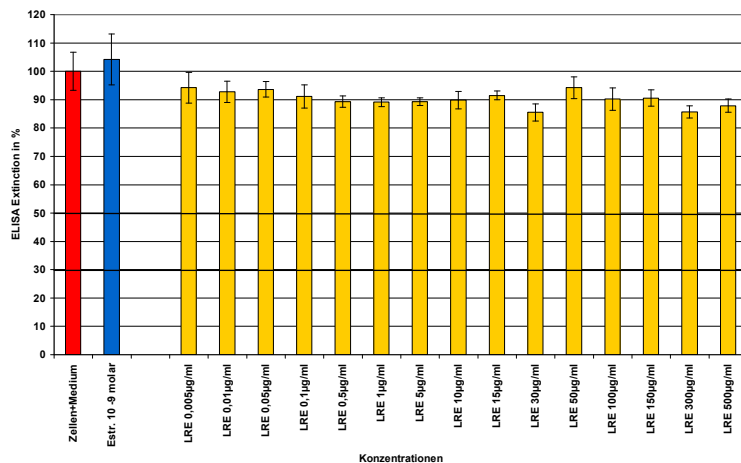
Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (100, 150 µg/ml): bis 88 %.

Mittlere Konzentrationen (30, 50 µg/ml): bis 87 %.

17-β Estradiol-Lysat: Wachstumsstimulation: auf 102 %, Ns.

Alle weiteren Extinctionswerte für die Expositionen mit den LRE-Konzentrationen schwanken relativ eng um 100 % (Zellwachstumsrate der Negativkontrolle 1).



**Abb. 31:** Diagramm des MTT-Tests 3 der Zelllinie MCF-7 unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Gelb: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (100 bis 500 µg/ml): bis 86 %.

Mittlere Konzentrationen (5 bis 30 µg/ml): bis 85 %.

Niedrige Konzentrationen (0,01 bis 1): bis 89 %.

17-β Estradiol-Lysat: Wachstumsstimulation: auf 104 %, Ns.

Die Exposition mit dem Leinsamenrohextrakt bewirkt eine generelle Repression der Tumorpherationsrate.

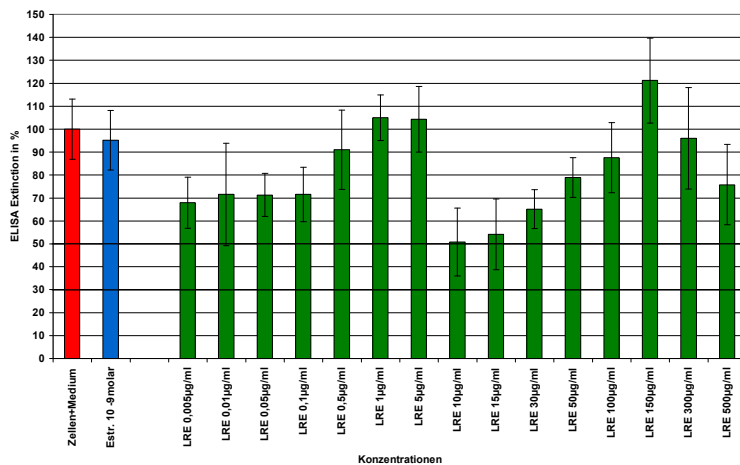
Es folgt eine Übersicht aller nach dem U-Test statistisch signifikanten Hemmungen bzw. Stimulationen (Tab. 8). Optisch hervorgehoben sind die signifikant bzw. tendenziell signifikanten Ergebnisse der Stimulationsversuche durch 17-β Estradiol-Lysat sowie die signifikanten Zellwachstumshemmungen bei Exposition mit hohen LRE-Konzentrationen. Die rechte Spalte dokumentiert statistisch signifikante Hemmungen niedriger bzw. mittlerer LRE-Konzentrationen sowie signifikante Wachstumsstimulationen jedweder Konzentration.

**Tab. 8:** Signifikante Hemmungen und Stimulationen der MCF-7 Zellen unter Leinsamenrohextrakt-Exposition im MTT-Test.

	17-β Estradiol-Lysat	Signifikante Hemmung hoher Konzentrationen	Weitere signifikante Hemmungen bzw. Stimulationen
Abb. 29	Stimulation, t(*)	500 µg/ml*	Hemmung: 50 µg/ml* Stimulation: 150 µg/ml*
Abb. 30	Stimulation, Ns	100, 150 µg/ml*	Hemmung: 30, 50 µg/ml*
Abb. 31	Stimulation, Ns	100, 150, 300, 500 µg/ml*	Hemmung: 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1, 5, 10, 15, 30 µg/ml*

Die Auswertung im U-Test nach Mann-Whitney zeigt, dass hohe Konzentrationen des LRE im MTT-Test im statistisch signifikanten Ausmaß dazu befähigt sind, das Zellwachstum der Zelllinie MCF-7 zu hemmen. Auch die durch mittlere (30, 50 µg/ml) sowie vereinzelt durch niedrige Konzentrationen (0,01 µg/ml u.a.) hervorgerufene Proliferationshemmung erweist sich als statistisch signifikant. Dabei wird die maximale Hemmung nicht immer bei der LRE-Höchstkonzentration erreicht. Eine signifikante Wachstumsstimulation wird für eine Konzentration von 150 µg/ml beobachtet; nicht signifikante Wachstumsstimulationen treten für weitere mittlere (5, 10 µg/ml) und vereinzelt für niedrige Konzentrationen auf. Die Positivkontrolle (17-β-Estradiol-Lysat) lässt in allen drei Testreihen eine Proliferationszunahme erkennen, welche jedoch nur in einem der Tests eine tendenzielle Signifikanz aufweist.

## BrdU-Test



**Abb. 32:** Diagramm des BrdU-Tests 1 der Zelllinie MCF-7 unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

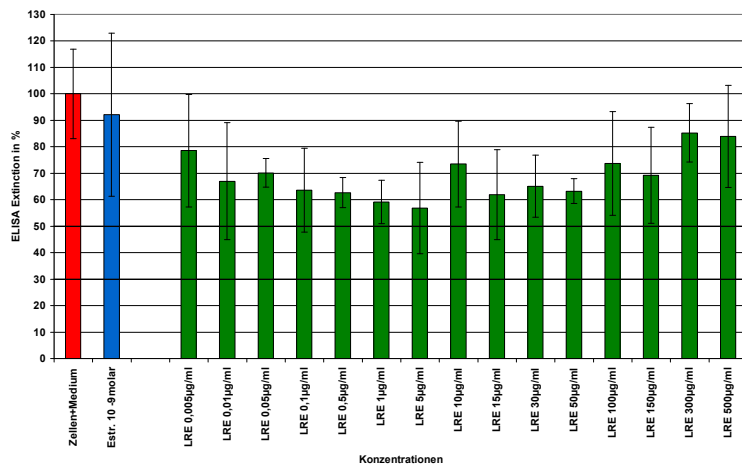
Grün: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

\* und t(\*): Mittlere Konzentrationen (10 bis 50 µg/ml): bis 51 %.

Niedrige Konzentrationen (0,005; 0,05; 0,1 µg/ml): bis 68 %.

17-β Estradiol-Lysat: Keine Wachstumsstimulation.



**Abb. 33:** Diagramm des BrdU-Tests 2 der Zelllinie MCF-7 unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Grün: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

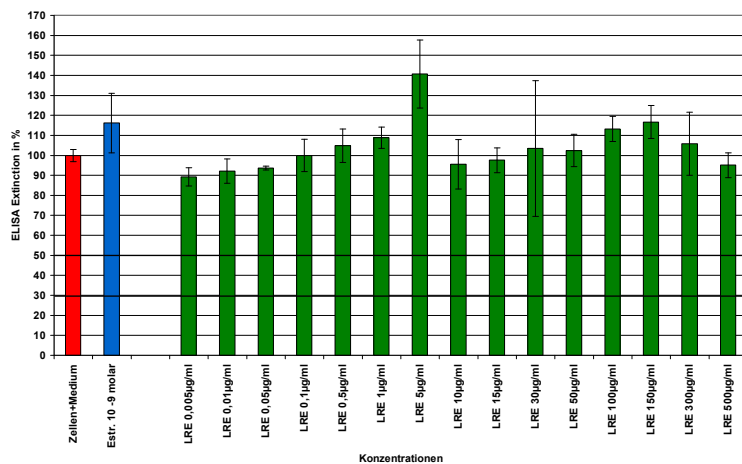
\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (100 bis 500 µg/ml): bis 69 %.

Mittlere Konzentrationen (5 bis 50 µg/ml): bis 57 %.

Niedrige Konzentrationen (0,05 bis 1 µg/ml): bis 59 %.

17-β Estradiol-Lysat: Keine Wachstumsstimulation.

Die Exposition mit dem Leinsamenrohextrakt bewirkt eine generelle Repression der Tumorphilisationsrate.



**Abb. 34:** Diagramm des BrdU-Tests 3 der Zelllinie MCF-7 unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Grün: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

\* und t(\*): Niedrige Konzentrationen (0,05 µg/ml): bis 94 %.

Wachstumsstimulation

\* und t(\*): 1, 5, 30, 50, 100, 150 µg/ml: auf max. 141 %

17-β Estradiol-Lysat: Wachstumsstimulation: auf 116 %, Ns.

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht aller nach dem U-Test im BrdU-Test statistisch signifikanten Hemmungen bzw. Stimulationen (Tab. 9).

**Tab. 9:** Signifikante Hemmungen und Stimulationen der MCF-7 Zellen unter Leinsamenrohextrakt-Exposition im BrdU-Test.

	<b>17-β Estradiol-Lysat</b>	<b>Signifikante Hemmungen hoher Konzentrationen</b>	Weitere signifikante Hemmungen und Stimulationen
<b>Abb. 32</b>	Keine Stimulation	-	Hemmung: 0,005; 0,05; 0,1 10, 15, 30, 50 µg/ml*
<b>Abb. 33</b>	Keine Stimulation	<b>150, 300 µg/ml*</b> <b>t(*): 100, 500 µg/ml</b>	Hemmung: 0,05; 0,1; 0,5; 1, 5, 15, 30, 50 µg/ml*
<b>Abb. 34</b>	Stimulation, Ns	-	Hemmung: 0,05 µg/ml* Stimulation: 1,5 µg/ml*

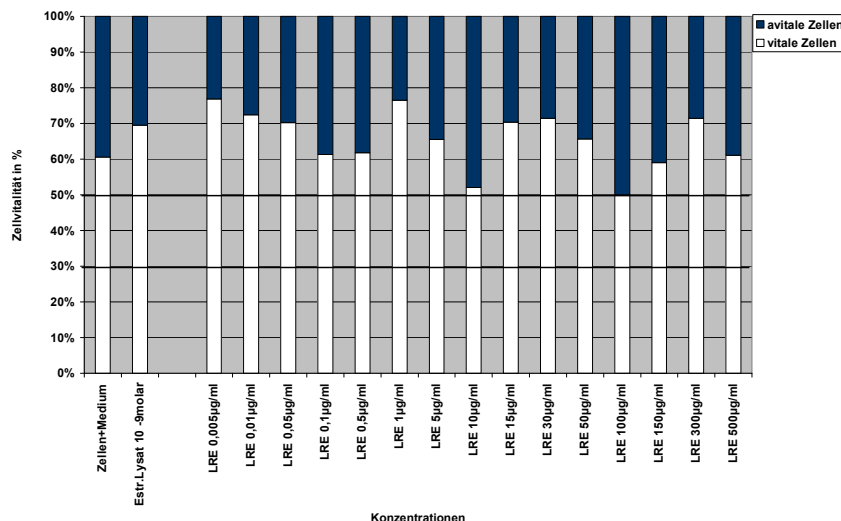
Für die Expositionsuntersuchungen der Zelllinie MCF-7 lässt sich im BrdU-Test eine Proliferationshemmung verstärkt bei niedrigen (0,01 µg/ml u.a.) und mittleren (10, 15 µg/ml) LRE-Konzentrationen nachweisen. Eine etwas geringer ausgeprägte Hemmung findet auch bei hohen Konzentrationen statt, lediglich in einem von drei Tests von statistischer Signifikanz. Im BrdU-Test sind mittlere Konzentrationen (1, 5 µg/ml) z.T. dazu befähigt, das Zellwachstum zu stimulieren.

Die Exposition mit 17-β Estradiol-Lysat bewirkt eine geringfügige, nicht signifikante Proliferationszunahme der Zelllinie MCF-7.

### **Zytotoxizitätstest**

Im Zytotoxizitätstest zeigen die MCF-7-Zellen unter LRE-Exposition eine Zellvitalität überwiegend im Vitalitätsbereich der Negativkontrolle 1 (um 61 %). Vereinzelt geht der Anteil vitaler Zellen auf 50 % zurück (für c = 10 und 100 µg/ml), dies entspricht 83 % der Negativkontrolle 1 (unbeeinflusstes Tumorwachstum). (Abb. 35).

Eine IC<sub>50</sub> ist nicht ermittelbar, da diese die Konzentration eines Hemmstoffes beschreibt, welche die Zellvitalität *in-vitro* auf 50 % der Vitalität der Negativkontrolle hemmt; im Zytotoxizitätstest jedoch besagte Hemmung der Zellvitalität lediglich auf minimal 83 % der Vitalität der Negativkontrolle erfolgt. Eine tendenzielle Abnahme der Zellvitalität mit ansteigender LRE-Konzentration ist nicht erkennbar. Eine Zytotoxizität des LRE oder der verwendeten Lösungsmittel ist nicht feststellbar.

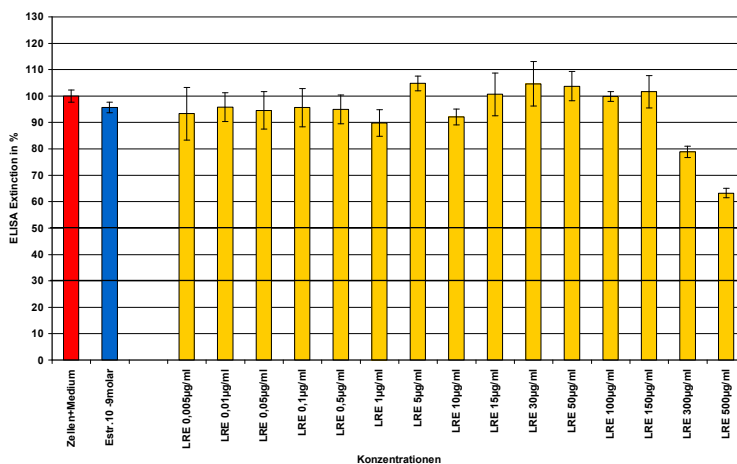


**Abb. 35:** Zellvitalität der MCF-7-Zellen im Zytotoxizitätstest unter Leinsamenrohextrakt-Exposition.

### 3.6.2 Ergebnisse der Zelllinie T47D

#### MTT-Test

Die Expositionsuntersuchungen der ER-positiven Mammacarcinomzelllinie T47D (Abb. 36-38) werden initial mit der Zellzahl 100 000 / ml durchgeführt. Niedrige Extinctionswerte machen eine Erhöhung auf die Zellzahl 1 000 000 / ml im letzten Testdurchlauf notwendig (Abb. 37). \* bezeichnet die Signifikanz eines Ergebnisses, t(\*) die tendenzielle Signifikanz. Ns kennzeichnet die nicht signifikanten Ergebnisse.



**Abb. 36:** Diagramm des MTT-Tests 1 der Zelllinie T47D unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Gelb: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (300, 500 µg/ml): bis 63 %.

Mittlere Konzentrationen (10 µg/ml): bis 92 %.

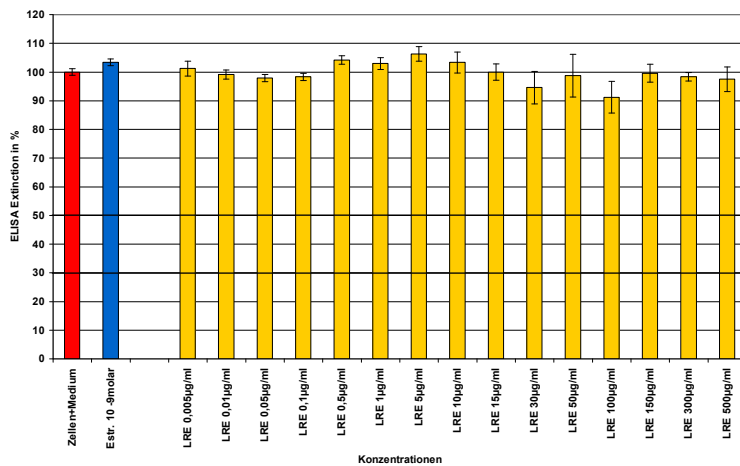
Niedrige Konzentrationen (1 µg/ml): bis 90 %.

Wachstumsstimulation

\* und t(\*): 5, 50 µg/ml: auf max. 105 %.

17-β Estradiol-Lysat: Keine Wachstumsstimulation.

Die Extinctionswerte für die übrigen LRE-Konzentrationen rangieren nahe 95 - 100 % der Negativkontrolle 1.



**Abb. 37:** Diagramm des MTT-Tests 2 der Zelllinie T47D unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

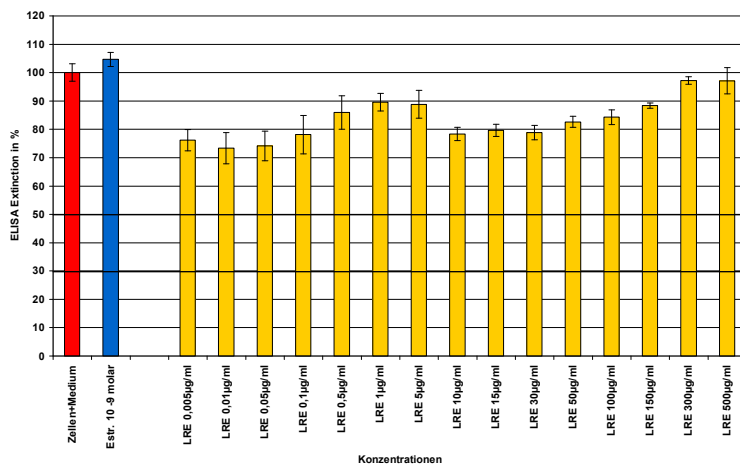
Gelb: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (100 µg/ml): bis 91 %.

17-β Estradiol-Lysat: Wachstumsstimulation: auf 103 %, Ns.

Aus der Exposition mit mittleren und niedrigen LRE-Konzentrationen resultieren Extinctionswerte um 100 % der Negativkontrolle 1.



**Abb. 38:** Diagramm des MTT-Tests 3 der Zelllinie T47D unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Gelb: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (100, 150 µg/ml): bis 84 %.

Mittlere Konzentrationen (5 bis 50 µg/ml): 78 %.

Niedrige Konzentrationen (0,005 bis 1 µg/ml): 73 %.

17-β Estradiol-Lysat: Wachstumsstimulation: auf 105 %, Ns.



Es folgt ein Überblick aller nach dem U-Test statistisch signifikanten Hemmungen bzw. Stimulationen (Tab. 10).

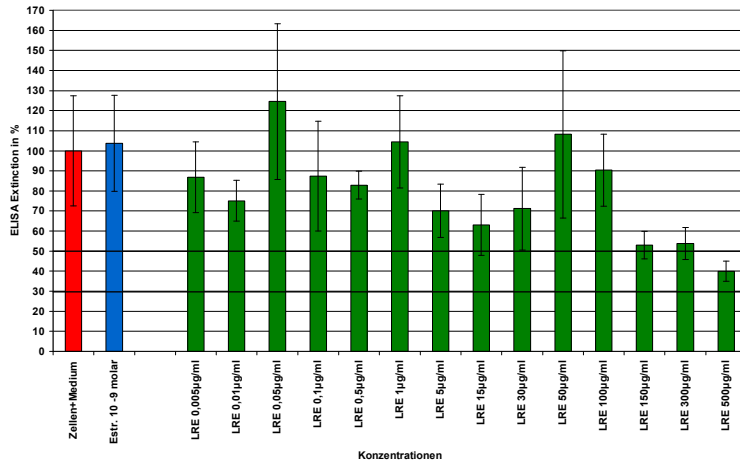
**Tab. 10:** Signifikante Hemmungen und Stimulationen der T47D-Zellen unter Leinsamenrohextrakt-Exposition im MTT-Test.

	<b>17-<math>\beta</math> Estradiol-Lysat</b>	<b>Signifikante Hemmung hoher Konzentrationen</b>	Weitere signifikante Hemmungen bzw. Stimulationen
<b>Abb. 36</b>	Keine Stimulation	<b>300, 500 <math>\mu\text{g/ml}^*</math></b>	Stimulation: 50 $\mu\text{g/ml}^*$
<b>Abb. 37</b>	Stimulation, Ns	<b>100 <math>\mu\text{g/ml}^*</math></b>	-
<b>Abb. 38</b>	Stimulation, Ns	<b>100, 150 <math>\mu\text{g/ml}^*</math></b>	Hemmung: 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 1, 10, 15, 30, 50 $\mu\text{g/ml}^*$

Der statistischen Auswertung zufolge sind hohe Konzentrationen des LRE in der Lage, die Proliferation der Zelllinie T47D signifikant zu hemmen. Die maximale Inhibition wird dabei häufig nicht für die Höchstkonzentration erreicht. Mittlere Rohextraktkonzentrationen (10, 30  $\mu\text{g/ml}$ ) bewirken eine zum Teil ausgeprägtere Proliferationshemmung, diese bleibt jedoch größtenteils ohne statistische Signifikanz. Wachstumsstimulationen treten für mittlere Konzentrationen (5, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) zu Tage, überwiegend ohne statistische Signifikanz. Die Wachstumsstimulationen durch die Positivkontrolle (17- $\beta$ -Estradiol-Lysat) präsentieren sich als nicht signifikant.

## BrdU

Die Exposition der Tumorzellen der ER-positiven Zelllinie T47D mit dem LRE führt im BrdU-Test zu folgenden Testergebnissen (Abb. 39-41):



**Abb. 39:** Diagramm des BrdU-Tests 1 der Zelllinie T47D unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Grün: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

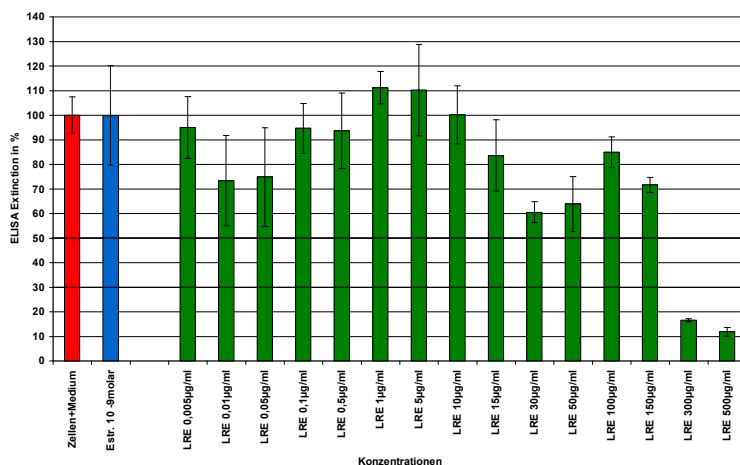
Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (150, 300, 500 µg/ml): bis 40 %.

Mittlere Konzentrationen (5, 15 µg/ml): bis 63 %.

Niedrige Konzentrationen (0,01 µg/ml): bis 75 %.

17-β Estradiol-Lysat: Wachstumsstimulation: auf 104 %, Ns.



**Abb. 40:** Diagramm des BrdU-Tests 2 der Zelllinie T47D unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Grün: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

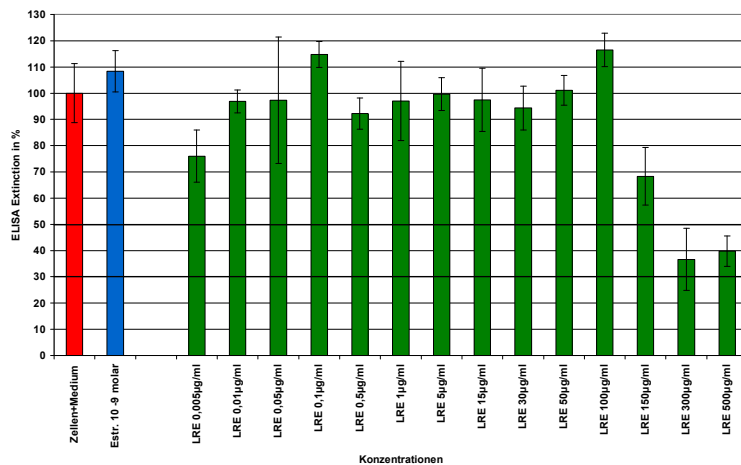
Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (300 µg/ml): bis 17 %.

Wachstumsstimulation

\* und t(\*): 1 µg/ml: auf 111 %.

17-β Estradiol-Lysat: Keine Wachstumsstimulation.



**Abb. 41:** Diagramm des BrdU-Tests 3 der Zelllinie T47D unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Grün: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (150, 300, 500 µg/ml): bis 37 %.

Niedrige Konzentrationen (0,005 µg/ml): bis 76 %.

Wachstumsstimulation

\* und t(\*): 0,1 und 100 µg/ml: auf max. 117 %

17-β Estradiol-Lysat: Wachstumsstimulation: auf 108 %, Ns.

Nachfolgende Tabelle enthält eine Übersicht aller nach dem U-Test statistisch signifikanten Hemmungen bzw. Stimulationen (Tab. 11).

**Tab. 11:** Signifikante Hemmungen und Stimulationen der Zelllinie T47D unter Leinsamenrohextrakt-Exposition im BrdU-Test.

	17-β Estradiol-Lysat	Signifikante Hemmung hoher Konzentrationen	Weitere signifikante Hemmungen und Stimulationen
<b>Abb. 39</b>	Stimulation, Ns	<b>150, 300, 500 µg/ml*</b>	-
<b>Abb. 40</b>	Keine Stimulation	<b>t(*): 300 µg/ml</b>	Stimulation: 1 µg/ml*
<b>Abb. 41</b>	Stimulation, Ns	<b>300, 500 µg/ml*</b> <b>t(*): 150 µg/ml</b>	Stimulation: 0,1; 100 µg/ml*

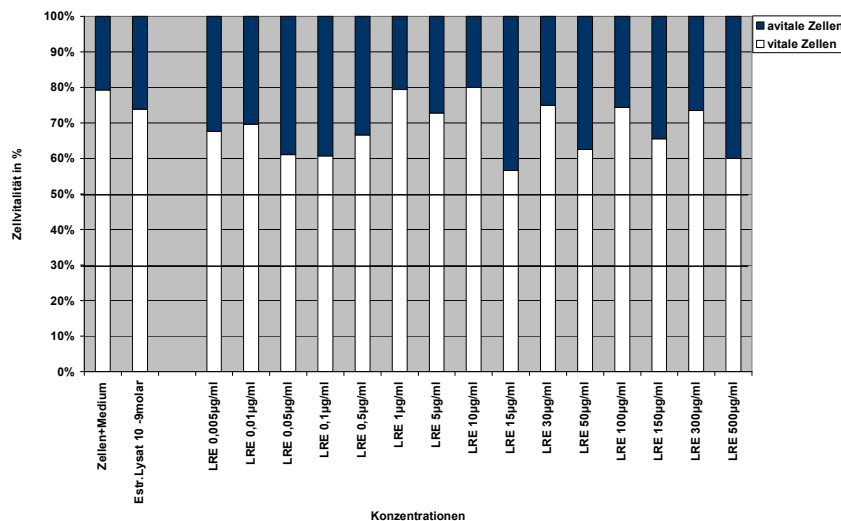
Wie aus den Abbildungen 39-41 hervorgeht, sind hohe Konzentrationen des LRE befähigt, die Proliferation der Zelllinie T47D ausgeprägt und signifikant zu hemmen. Mittlere (15, 30 µg/ml) und niedrige Konzentrationen (0,01 µg/ml u.a.) hemmen im BrdU-Test ebenfalls das Tumorwachstum, dies jedoch ohne statistische Signifikanz. Wachstumsstimulationen

beobachten wir bei niedriger (inhomogen), mittlerer (1 µg/ml) sowie einmalig bei hoher Konzentration (100 µg/ml), nur vereinzelt mit statistischer Signifikanz. Die Wachstumsstimulationen durch 17-β-Estradiol-Lysat erweisen sich als nicht signifikant.

## Zytotoxizitätstest

Im Zytotoxizitätstest der Zelllinie T47D bewegt sich der prozentuale Anteil vitaler Zellen überwiegend um 70 %. Die Negativkontrolle 1 erreicht einen Vitalitätswert von 79 % (Abb. 42).

Der geringste prozentuale Anteil vitaler Zellen findet sich bei mittlerer LRE-Konzentration (15 µg/ml) und erreicht 71 % der Negativkontrolle 1. Eine IC<sub>50</sub> ist somit nicht ermittelbar. Ebenso ist eine Verminderung der Vitalität mit steigender LRE-Konzentration nicht zu verzeichnen. Eine Zytotoxizität der eingesetzten Substanzen ist nicht feststellbar,



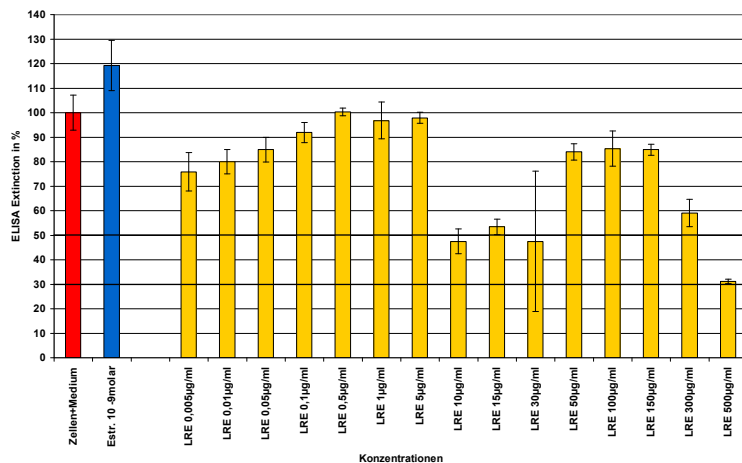
**Abb. 42:** Zellvitalität der T47D-Zellen im Zytotoxizitätstest unter Leinsamenrohextrakt-Exposition.

## 3.6.3 Ergebnisse der Zelllinie HCC-70

### MTT-Test

Die Abbildungen 43-48 stellen den Verlauf der Zellproliferationsrate der ER-positiven Mammacarcinomzellen der Zelllinie HCC-70 in Abhängigkeit von der LRE-Konzentration im MTT- sowie im BrdU-Test dar. Die Expositionsuntersuchungen wurden mit einer Zellzahl von 100 000 pro ml durchgeführt.

\* bezeichnet die Signifikanz eines Ergebnisses, t(\*) die tendenzielle Signifikanz. Ns kennzeichnet die nicht signifikanten Ergebnisse.



**Abb. 43:** Diagramm des MTT-Tests 1 der Zelllinie HCC-70 unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

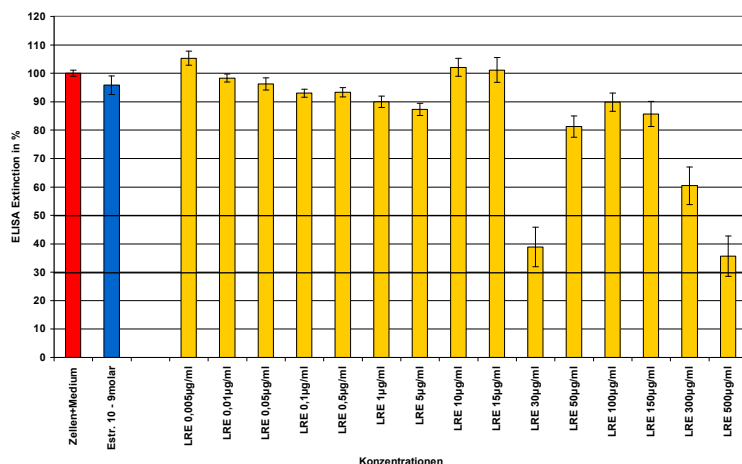
Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Gelb: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (100 bis 500 µg/ml): bis 31 %.  
Mittlere Konzentrationen (10, 15, 50 µg/ml): bis 47 %.  
Niedrige Konzentrationen (0,005; 0,01; 0,05 µg/ml): bis 76 %.

17-β Estradiol-Lysat: Wachstumsstimulation: auf 120 %, t(\*).



**Abb. 44:** Diagramm des MTT-Tests 2 der Zelllinie HCC-70 unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Gelb: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

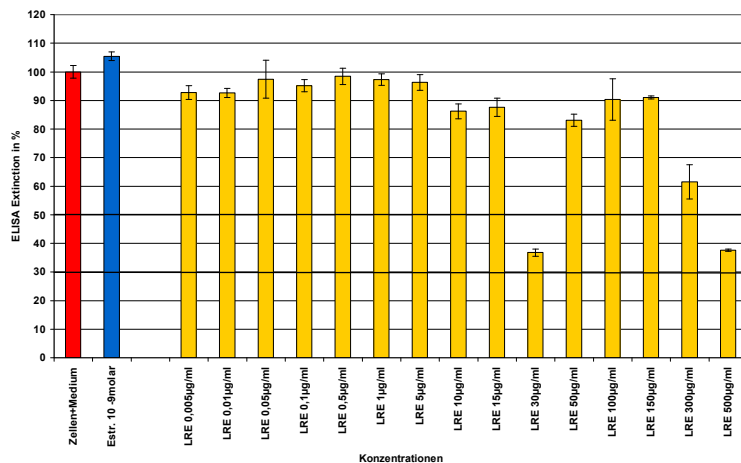
Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (100 bis 500 µg/ml): bis 36 %.  
Mittlere Konzentrationen (5, 30, 50 µg/ml): bis 39 %.  
Niedrige Konzentrationen (0,05; 0,1; 0,5; 1 µg/ml): bis 90 %.

Wachstumsstimulation

\* und t(\*): 0,005 µg/ml: auf 105 %.

17-β Estradiol-Lysat: Keine Wachstumsstimulation.



**Abb. 45:** Diagramm des MTT-Tests 3 der Zelllinie HCC-70 unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Gelb: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (100 bis 500 µg/ml): bis 38 %.

Mittlere Konzentrationen (10 bis 50 µg/ml): bis 37 %.

Niedrige Konzentrationen (0,005; 0,01; 0,1 µg/ml): bis 93 %.

17-β Estradiol-Lysat: Wachstumsstimulation: auf 105 %, \*.

Die nachfolgende Tabelle (Tab. 12) bietet eine Übersicht aller nach dem U-Test statistisch signifikanten Proliferationshemmungen bzw. -stimulationen.

**Tab. 12:** Signifikante Hemmungen und Stimulationen der HCC-70-Zellen unter Leinsamenrohextrakt-Exposition im MTT-Test.

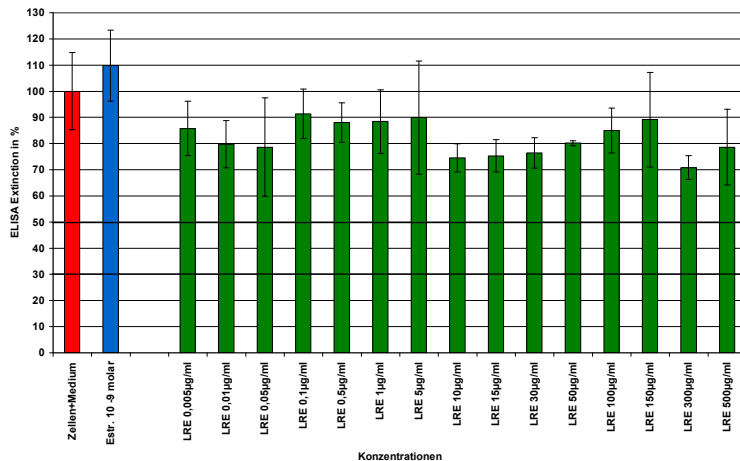
	17-β Estradiol-Lysat	Signifikante Hemmung hoher Konzentrationen	Weitere signifikante Hemmungen bzw. Stimulationen
Abb. 43	Stimulation, t(*)	150, 300, 500 µg/ml* t(*):100 µg/ml	Hemmung: 0,005; 0,01; 0,05; 10, 15, 50 µg/ml*
Abb. 44	Keine Stimulation	100, 150, 300, 500 µg/ml*	Hemmung: 0,05; 0,1; 0,5; 1, 5, 30, 50 µg/ml* Stimulation: 0,005 µg/ml*
Abb. 45	Stimulation, *	150, 300, 500 µg/ml* t(*): 100 µg/ml	Hemmung: 0,005; 0,01; 10, 15, 30, 50 µg/ml*

Nach statistischer Auswertung mittels U-Test nach Mann-Whitney ist der lignanangereicherte LRE in hohen Konzentrationen in der Lage, in statistisch signifikantem Maße die Zellproliferation der ER-positiven Mammacarcinomzelllinie HCC-70 zu hemmen. Zu einer signifikanten Hemmung des Zellwachstums führt ebenfalls die Exposition mit niedrigen (0,005; 0,001 µg/ml) und mittleren Rohextraktkonzentrationen (10, 15, 30 µg/ml). Die

maximale Proliferationshemmung werden für mittlere (30 µg/ml) und hohe (500 µg/ml) Konzentrationen. Vereinzelt tritt eine signifikante Wachstumsstimulation bei niedriger LRE-Konzentration (0,005 µg/ml) auf.

Durch 17-β- Estradiol-Lysat wird eine z. T. signifikante Wachstumsstimulation erreicht.

## BrdU-Test



**Abb. 46:** Diagramm des BrdU-Tests 1 der Zelllinie HCC-70 unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

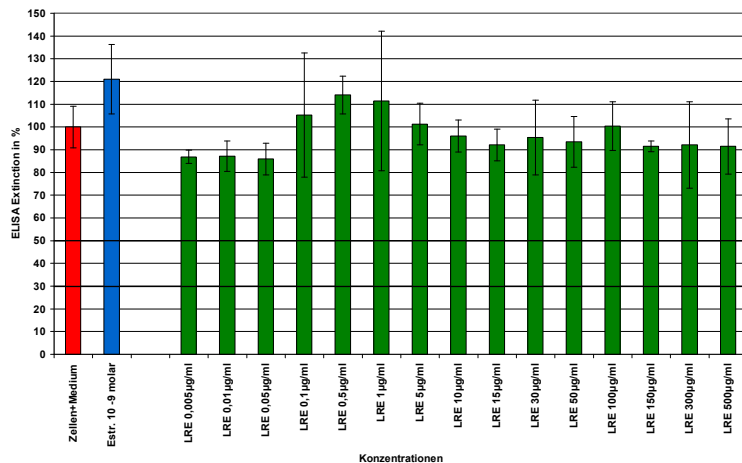
Grün: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (300 µg/ml): bis 71 %.

Mittlere Konzentrationen (10 bis 50 µg/ml): bis 75 %.

17-β Estradiol-Lysat: Wachstumsstimulation: auf 110 %, Ns.



**Abb. 47:** Diagramm des BrdU-Tests 2 der Zelllinie HCC-70 unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

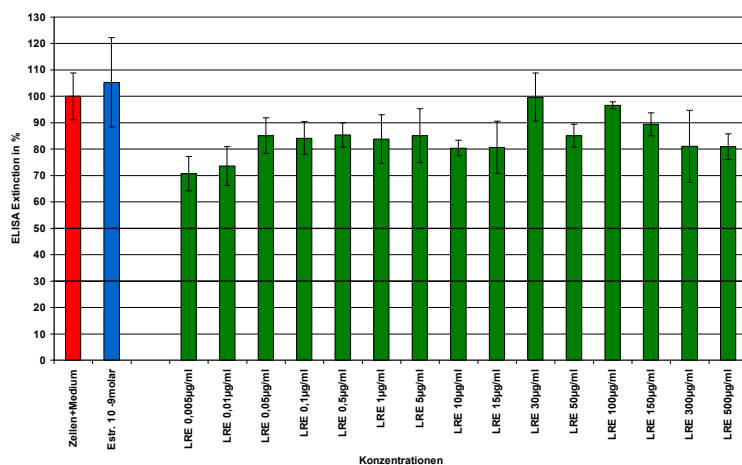
Grün: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (150 µg/ml): bis 91 %.

Niedrige Konzentrationen (0,005; 0,01; 0,05 µg/ml): bis 86 %.

17-β Estradiol-Lysat: Wachstumsstimulation: auf 121 %, Ns.



**Abb. 48:** Diagramm des BrdU-Tests 3 der Zelllinie HCC-70 unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Grün: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (300, 500 µg/ml): bis 81 %.

Mittlere Konzentrationen (10, 15, 50 µg/ml): bis 80 %.

Niedrige Konzentrationen (0,005 bis 0,5 µg/ml): bis 71 %.

17-β Estradiol-Lysat: Wachstumsstimulation: auf 105 %, Ns.

Nachfolgende Tabelle enthält einen Überblick aller nach dem U-Test statistisch signifikanten Hemmungen bzw. Stimulationen (Tab. 13).



**Tab. 13:** Signifikante Hemmungen und Stimulationen der Zelllinie HCC-70 unter Leinsamenrohextrakt-Exposition im BrdU-Test.

	<b>17-<math>\beta</math> Estradiol-Lysat</b>	<b>Signifikante Hemmung hoher Konzentrationen</b>	Weitere signifikante Hemmungen und Stimulationen
<b>Abb. 46</b>	Stimulation, Ns	<b>300 <math>\mu\text{g/ml}^*</math></b>	Hemmung: 10, 15, 30, 50 $\mu\text{g/ml}^*$
<b>Abb. 47</b>	Stimulation, Ns	<b>t(*): 150 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	Hemmung: 0,005; 0,01 $\mu\text{g/ml}^*$
<b>Abb. 48</b>	Stimulation, Ns	<b>500 <math>\mu\text{g/ml}^*</math> t(*): 300 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	Hemmung: 0,005; 0,01; 0,5; 10, 50 $\mu\text{g/ml}^*$

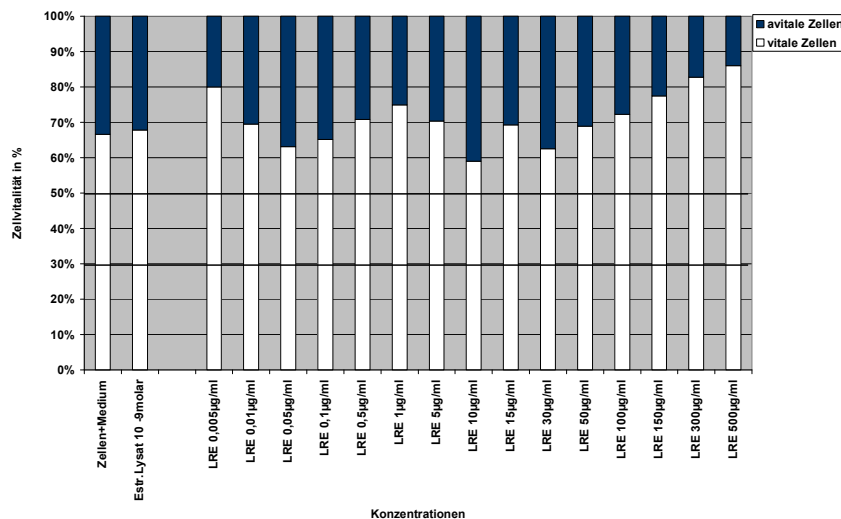
In Betrachtung aller drei BrdU-Testreihen lässt sich feststellen, dass der LRE in hohen Konzentrationen dazu befähigt ist, in statistisch signifikantem Maße die Zellproliferation der ER-positiven Mammacarcinomzelllinie HCC-70 zu hemmen. Hierbei scheinen niedrige Konzentrationen (0,005, 0,01  $\mu\text{g/ml}$  u.a.) eine z. T. ausgeprägtere Hemmung auszulösen als hohe. Ebenso bewirken mittlere Konzentrationen (10, 15, 30  $\mu\text{g/ml}$ ) eine Wachstumshemmung der Tumorzellen, diese ist jedoch nur teilweise signifikant. Vereinzelt lassen sich nicht signifikante Wachstumsstimulationen im Bereich niedriger Konzentrationen beobachten.

Die Positivkontrolle erreicht in allen drei Testreihen eine Zunahme der Proliferation, welche sich jedoch als statistisch nicht signifikant erweist.

### **Zytotoxizitätstest**

Der Anteil vitaler Zellen bewegt sich für alle LRE-Konzentrationen im Bereich der Vitalität der Negativkontrolle (67 %). Eine Zunahme der avitalen Zellen bei Exposition mit ansteigenden LRE Konzentrationen ist nicht erkennbar. Die minimale Zellvitalität liegt bei 59 % (für  $c = 10 \mu\text{g/ml}$ ), dies entspricht 87 % der Vitalität der Negativkontrolle 1 (Abb. 49).

Die Wirkung von LRE und Lösungsmitteln wird als nicht zytotoxisch eingestuft. Eine  $\text{IC}_{50}$  ist nicht ermittelbar.



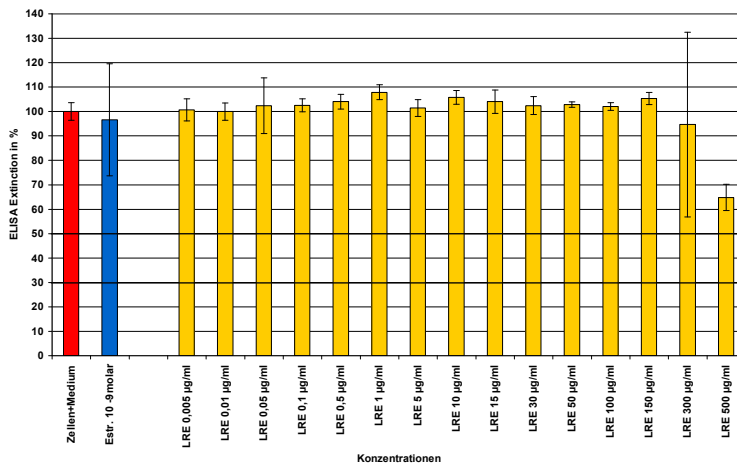
**Abb. 49:** Zellvitalität der Zelllinie HCC-70 im Zytotoxizitätstest unter Leinsamenrohextrakt-Exposition.

### 3.5.5 Ergebnisse der Zelllinie BT20

#### MTT-Test

Die Abbildungen 50-55 zeigen die Ergebnisse der Expositionsuntersuchungen an der ER-negativen Mammacarcinomzelllinie BT20. Die Testreihen erfolgen mit einer Zellzahl von 100 000 Zellen pro ml.

\* bezeichnet die Signifikanz eines Ergebnisses, t(\*) die tendenzielle Signifikanz. Ns kennzeichnet die nicht signifikanten Ergebnisse.



**Abb. 50:** Diagramm des MTT-Tests 1 der Zelllinie BT20 unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Gelb: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

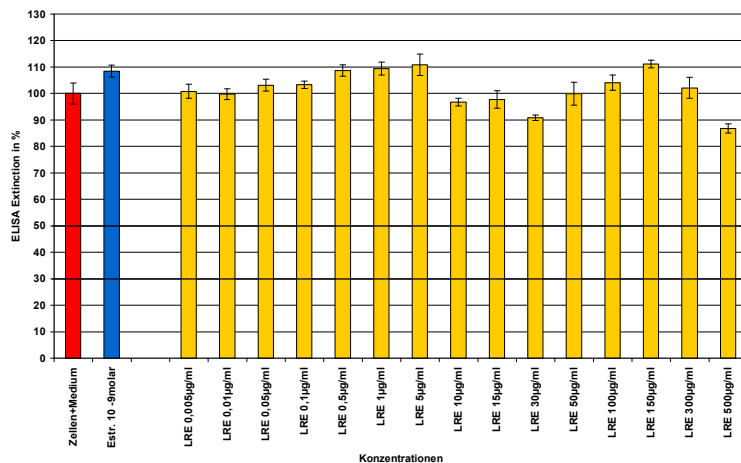
\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (500 µg/ml): bis 65 %.

Wachstumsstimulation

\* und t(\*): 1, 10 µg/ml: auf max. 108 %.

17-β Estradiol-Lysat: Keine Wachstumsstimulation

Für alle weiteren LRE-Konzentrationen bewegen sich die Extinctionswerte bei 100 % der Negativkontrolle 1.



**Abb. 51:** Diagramm des MTT-Tests 2 der Zelllinie BT20 unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Gelb: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

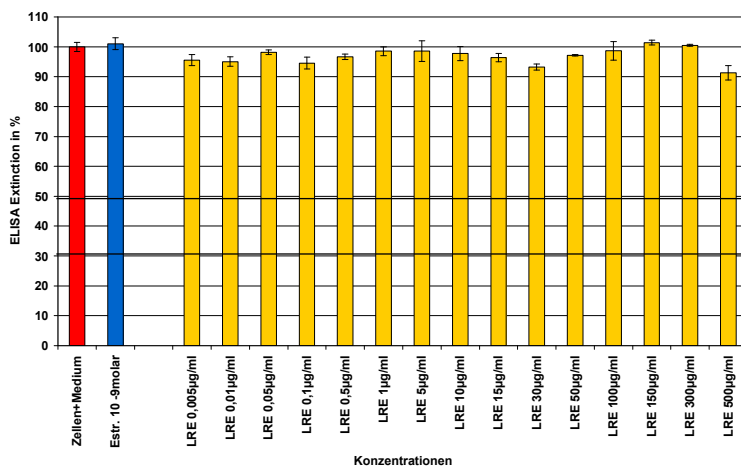
\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (500 µg/ml): bis 87 %.

Mittlere Konzentrationen (10, 30 µg/ml): bis 91 %.

Wachstumsstimulation

\* und t(\*): 0,5; 1, 5 und 150 µg/ml: auf max. 111 %.

17-β Estradiol-Lysat: Wachstumsstimulation: auf 108 %, t(\*).



**Abb. 52:** Diagramm des MTT-Tests 3 der Zelllinie BT20 unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Gelb: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (500 µg/ml): bis 91 %.

Mittlere Konzentrationen (15 bis 50 µg/ml): bis 93 %.

Niedrige Konzentrationen (0,005 bis 0,5 µg/ml): bis 95 %.

17-β Estradiol-Lysat: Geringe Wachstumsstimulation, Ns.

In der Übersicht aufgelistet finden sich alle nach dem U-Test statistisch signifikanten Hemmungen bzw. Stimulationen (Tab 14).

**Tab. 14:** Signifikante Hemmungen und Stimulationen der Zelllinie BT20 unter Leinsamenrohextrakt-Exposition im MTT-Test.

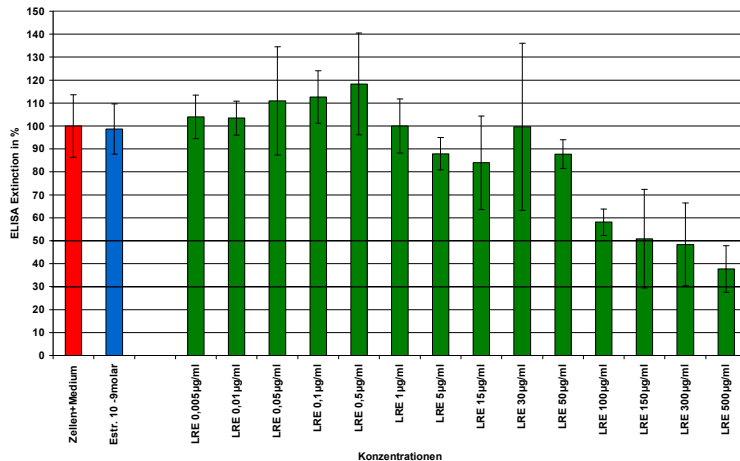
	<b>17-<math>\beta</math> Estradiol-Lysat</b>	<b>Signifikante Hemmung hoher Konzentrationen</b>	Weitere signifikante Hemmungen bzw. Stimulationen
<b>Abb. 50</b>	Keine Stimulation	<b>500 <math>\mu\text{g/ml}^*</math></b>	Stimulation: 1, 10 $\mu\text{g/ml}^*$
<b>Abb. 51</b>	<b>Stimulation, t(*)</b>	<b>500 <math>\mu\text{g/ml}^*</math></b>	Hemmung: 30 $\mu\text{g/ml}^*$ Stimulation: 1, 5, 150 $\mu\text{g/ml}^*$
<b>Abb. 52</b>	Stimulation, Ns	<b>500 <math>\mu\text{g/ml}^*</math></b>	Hemmung: 0,005; 0,01; 0,1; 0,5; 15, 30, 50 $\mu\text{g/ml}^*$

Wie die statistische Auswertung zeigt, lässt sich die ER-negative Zelllinie BT20 durch die Höchstkonzentration des LRE in ihrer Proliferation signifikant hemmen. Dies trifft für alle drei Testreihen zu. Auch mittlere (15, 30  $\mu\text{g/ml}$ ) und auch niedrige (0,005  $\mu\text{g/ml}$  u.a.) LRE-Konzentrationen können die Proliferationsrate z. T. signifikant hemmen.

Ebenfalls sind signifikante Wachstumsstimulationen, zweimalig im niedrigen (1  $\mu\text{g/ml}$ ) und mittleren (5, 10  $\mu\text{g/ml}$ ) sowie einmalig auch im hohen (150  $\mu\text{g/ml}$ ) Konzentrationsbereich, im MTT-Test nachweisbar. Die Positivkontrolle bewirkt lediglich in einem der drei Tests eine tendenziell signifikante Stimulation.

## BrdU-Test

Abbildungen 53-55 zeigen den Verlauf der Extinctionswerte unter ansteigender LRE-Exposition für die ER-negative Mammacarcinomzelllinie BT20 im BrdU-Test.



**Abb. 53:** Diagramm des BrdU-Tests 1 der Zelllinie BT20 unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

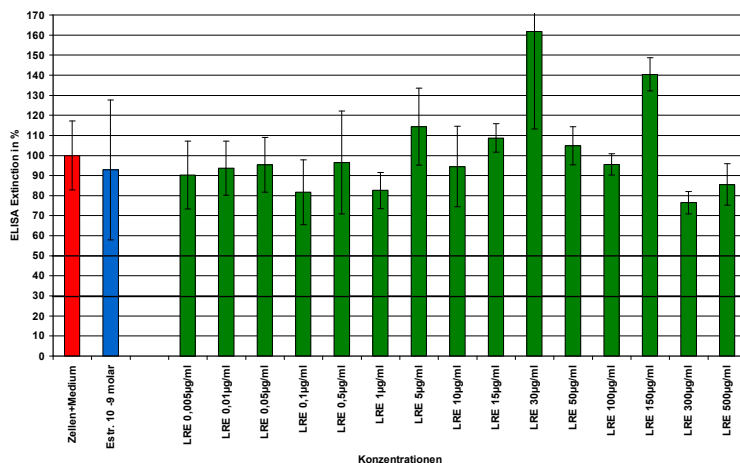
Grün: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (100, 150, 300, 500 µg/ml): bis 38 %.

17-β Estradiol-Lysat: Keine Wachstumsstimulation.

Die übrigen Extinctionswerte schwanken um die 100 % der Negativkontrolle 1.



**Abb. 54:** Diagramm des BrdU-Tests 2 der Zelllinie BT20 unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Grün: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

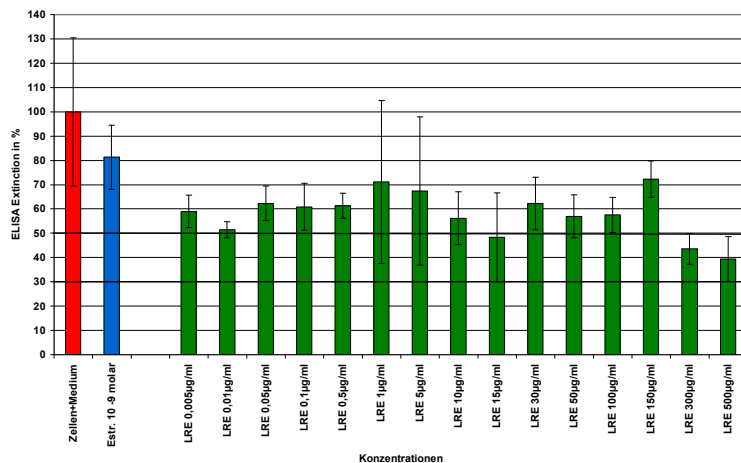
Wachstumshemmung

\* und t(\*): -

Wachstumsstimulation

\* und t(\*): 30 und 150 µg/ml: auf max. 162 %

17-β Estradiol-Lysat: Keine Wachstumsstimulation.



**Abb. 55:** Diagramm des BrdU-Tests 3 der Zelllinie BT-20 unter Leinsamenrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Grün: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (300, 500 µg/ml): bis 39 %.

Mittlere Konzentrationen (15 µg/ml): bis 48 %.

Niedrige Konzentrationen (0,01 µg/ml): bis 51 %.

17-β Estradiol-Lysat: Keine Wachstumsstimulation.

Die Testreihe 3 zeigt eine generelle Repression des Tumorwachstums unter LRE-Exposition.

Nachfolgende Tabelle enthält eine zusammenfassende Übersicht aller nach dem U-Test statistisch signifikanten Hemmungen bzw. Stimulationen (Tab. 15).

**Tab. 15:** Signifikante Hemmungen und Stimulationen der Zelllinie BT20 unter Leinsamenrohextrakt-Exposition im BrdU-Test.

	17-β Estradiol-Lysat	Signifikante Hemmung hoher Konzentrationen	Weitere signifikante Hemmungen und Stimulationen
<b>Abb. 53</b>	Keine Stimulation	100, 150, 300, 500 µg/ml*	-
<b>Abb. 54</b>	Keine Stimulation	-	Stimulation: 30, 150 µg/ml*
<b>Abb. 55</b>	Keine Stimulation	300 µg/ml* t(*): 500 µg/ml	-

Wie aus den Diagrammen 53-55 ersichtlich, lässt sich die ER-negative Zelllinie BT20 durch hohe LRE-Konzentrationen in ihrer Proliferation z.T. statistisch signifikant hemmen.

Nicht signifikant wirken ebenfalls mittlere Konzentrationen (15 µg/ml) antiproliferativ.

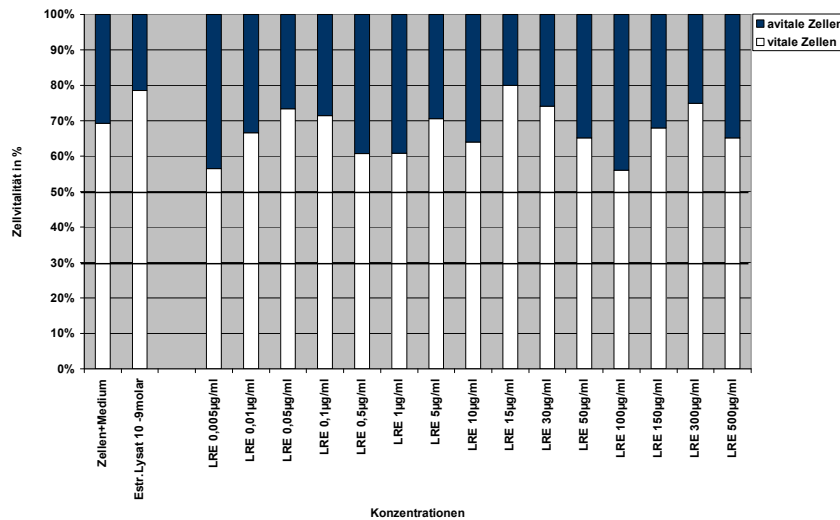
Als statistisch signifikant erweisen sich Wachstumsstimulationen, welche einmalig bei mittlerer (30 µg/ml) und hoher (150 µg/ml) LRE-Konzentration im BrdU-Test auftreten.

Die Positivkontrolle bewirkt in keinem der Tests eine Stimulation der Tumorphiliferationsrate.

## Zytotoxizitätstest

Im Zytotoxizitätstest erreicht der prozentuale Anteil vitaler Zellen der Negativkontrolle 1 einen Wert von 69 %. Die Vitalität der Tumorzellen unter LRE-Exposition schwankt um diesen Wert. Die niedrigste Zellvitalität wird bei einer LRE-Konzentration von 100 µg/ml erreicht und entspricht 81 % der Negativkontrolle 1 (Abb. 56)..

Eine tendenzielle Abnahme der Vitalität mit steigender LRE-Konzentration ist nicht festzustellen. Der Einfluss des LRE und der eingesetzten Lösungsmittel wird als nicht zytotoxisch eingestuft. Eine  $IC_{50}$  ist nicht ermittelbar.



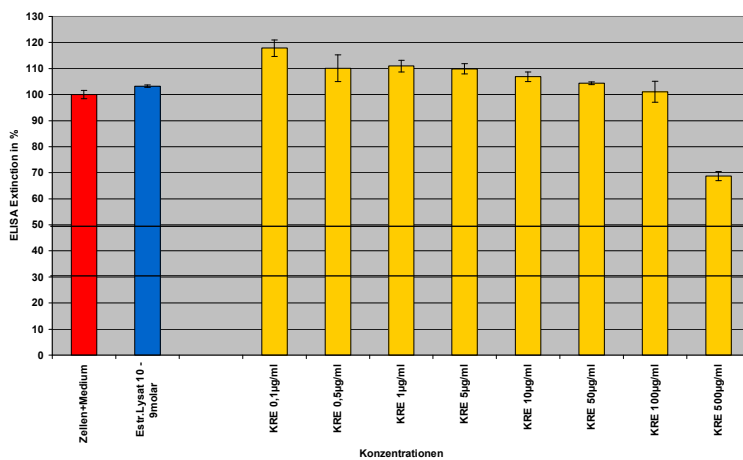
**Abb. 56:** Zellvitalität der Zelllinie BT20 im Zytotoxizitätstest unter Leinsamenrohextrakt-Exposition.

### 3.6 Die Ergebnisse der Zelllinie MCF-7 für die Exposition mit dem Kürbiskernrohextrakt

#### MTT-Test

Die folgenden Abbildungen (57-59) zeigen den Verlauf der Tumorphorationsrate der Zelllinie MCF-7 unter KRE-Exposition in den Konzentrationen 0,1 bis 500 µg/ml. Für die Untersuchungen wird eine Zellzahl von 100 000 pro ml eingesetzt. Die Negativkontrolle 1 befindet sich links im Diagramm. Als Positivkontrolle, ebenfalls links abgebildet, fungiert 17-β Estradiol-Lysat in einer Konzentration von  $10^{-9}$  molar.

\* bezeichnet die Signifikanz eines Ergebnisses, t(\*) die tendenzielle Signifikanz. Ns kennzeichnet die nicht signifikanten Ergebnisse.



**Abb. 57:** Diagramm des MTT-Tests 1 der Zelllinie MCF-7 unter Kürbiskernrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Gelb: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

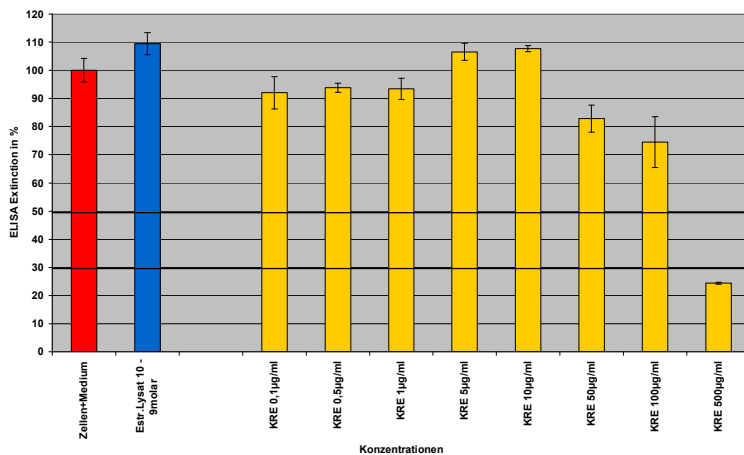
\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (500 µg/ml): bis 69 %.

Wachstumsstimulation

\* und t(\*): 0,1; 0,5; 1, 5, 10, 50 µg/ml: auf max. 118%.

17-β Estradiol-Lysat: Wachstumsstimulation auf 103 %, \*.





**Abb. 58:** Diagramm des MTT-Tests 2 der Zelllinie MCF-7 unter Kürbiskernrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Gelb: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (100, 500 µg/ml): bis 24 %.

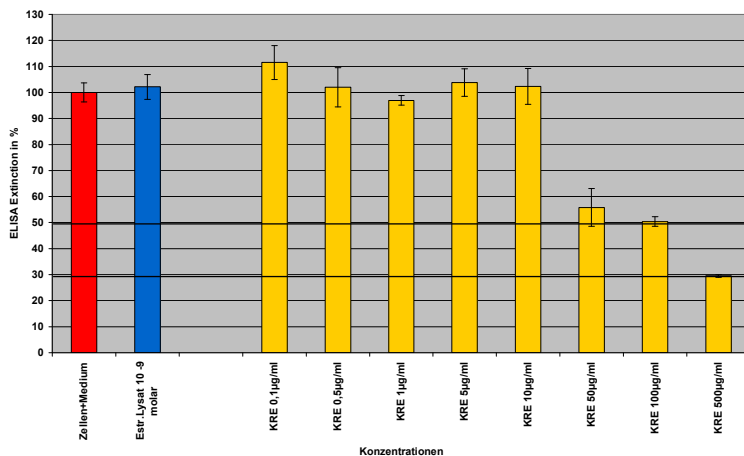
Mittlere Konzentrationen (50 µg/ml): bis 83 %.

Niedrige Konzentrationen (0,5; 1 µg/ml): bis 93 %.

Wachstumsstimulation

\* und t(\*): 5, 10 µg/ml: auf max. 108 %.

17-β Estradiol-Lysat: Wachstumsstimulation auf 109 %, t(\*).



**Abb. 59:** Diagramm des MTT-Tests 3 der Zelllinie MCF-7 unter Kürbiskernrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Gelb: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (100, 500 µg/ml): bis 30 %.

Mittlere Konzentrationen (50 µg/ml): bis 56 %.

Wachstumsstimulation

\* und t(\*): 0,1 µg/ml: auf max. 111 %.

17-β Estradiol-Lysat: Wachstumsstimulation auf 102 %, Ns.

Die folgende Tabelle enthält eine Übersicht aller im MTT-Test signifikanten Hemmungen bzw. Stimulationen der Proliferationsrate der MCF-7-Zellen unter KRE-Exposition (Tab. 16).

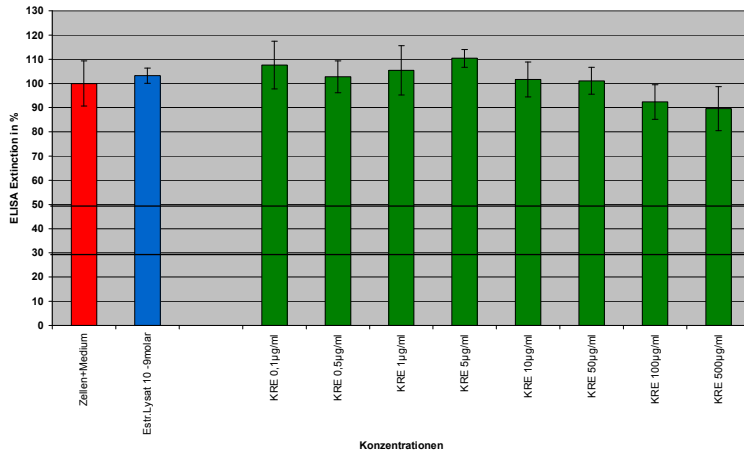
**Tab. 16:** Signifikante Hemmungen und Stimulationen der Zelllinie MCF-7 unter Kürbiskernrohextrakt-Exposition im MTT-Test.

	<b>17-<math>\beta</math> Estradiol-Lysat</b>	<b>Signifikante Hemmung hoher Konzentrationen</b>	Weitere signifikante Hemmungen und Stimulationen
<b>Abb. 57</b>	<b>Stimulation, *</b>	<b>500 <math>\mu\text{g/ml}^*</math></b>	Stimulation: 0,1; 0,5; 1, 5, 10, 50 $\mu\text{g/ml}^*$
<b>Abb. 58</b>	<b>Stimulation, t(*)</b>	<b>100, 500 <math>\mu\text{g/ml}^*</math></b>	Hemmung: 0,5; 1,50 $\mu\text{g/ml}^*$ Stimulation: 10 $\mu\text{g/ml}^*$
<b>Abb. 59</b>	Stimulation, Ns	<b>100, 500 <math>\mu\text{g/ml}^*</math></b>	Hemmung: 50 $\mu\text{g/ml}^*$ Stimulation: 0,1 $\mu\text{g/ml}^*$

In der statistischen Auswertung mittels U-Test nach Mann-Whitney ist der Lignanextrakt aus dem Kürbiskern in hohen Konzentrationen dazu befähigt, die Proliferation der Mammacarcinomzelllinie MCF-7 signifikant zu hemmen. Die maximale Hemmung wird hierbei für die höchste Extraktkonzentration (500  $\mu\text{g/ml}$ ) erreicht. In allen drei Testreihen ist zudem eine z.T. signifikante Zunahme der Zellproliferation für die Exposition mit mittleren (5, 10  $\mu\text{g/ml}$ ) sowie mit niedrigen (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) KRE-Konzentrationen zu beobachten. Die Exposition mit der Positivkontrolle (17- $\beta$  Estradiol-Lysat) bewirkt eine Wachstumsstimulation, die sich teilweise als signifikant erweist.

## BrdU-Test

Die Abbildungen 60-62 demonstrieren die Ergebnisse des Proliferationstestes BrdU für die Expositionsuntersuchungen mit dem KRE.



**Abb. 60:** Diagramm des BrdU-Tests 1 der Zelllinie MCF-7 unter Kürbiskernrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Grün: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

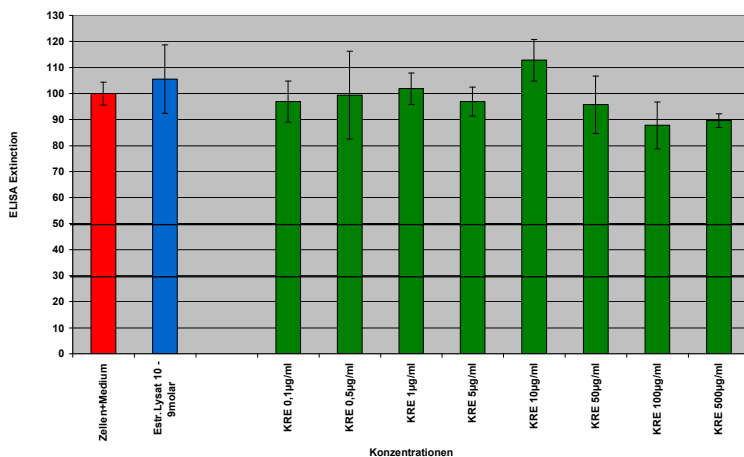
Wachstumshemmung

\* und t(\*): -

Wachstumsstimulation

\* und t(\*): 5 µg/ml: auf max. 110 %.

17-β Estradiol-Lysat: Wachstumsstimulation auf 103 %, Ns.



**Abb. 61:** Diagramm des BrdU-Tests 2 der Zelllinie MCF-7 unter Kürbiskernrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Grün: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

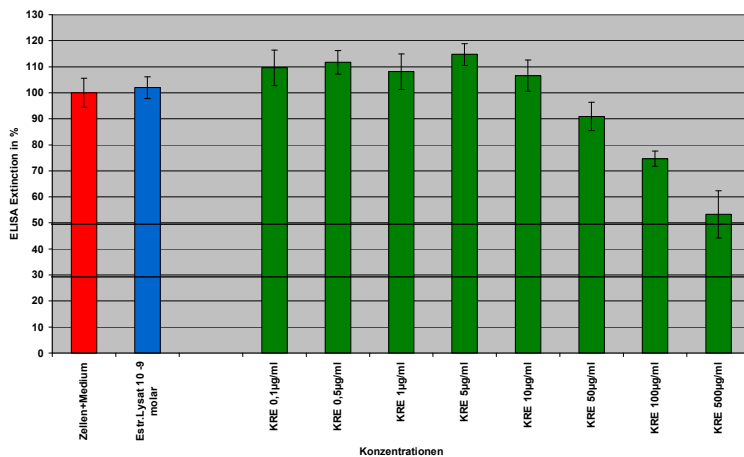
Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (100, 500 µg/ml): bis 88 %.

Wachstumsstimulation

\* und t(\*): 10 µg/ml: auf max. 113 %.

17-β Estradiol-Lysat: Wachstumsstimulation auf 105 %, Ns.



**Abb. 62:** Diagramm des BrdU-Tests 3 der Zelllinie MCF-7 unter Kürbiskernrohextrakt-Exposition:

Rot: Zellen+Medium (Negativkontrolle 1)

Blau: Zellen+17-β Estradiol-Lysat (Positivkontrolle), Konzentration in [molar]

Grün: Zellen+Leinsamenrohextrakt, Konzentration in [µg/ml]

Wachstumshemmung

\* und t(\*): Hohe Konzentrationen (100, 500 µg/ml): bis 53 %.  
Mittlere Konzentrationen (50 µg/ml): bis 91 %.

Wachstumsstimulation

\* und t(\*): 0,5; 5 µg/ml: auf max. 115 %.

17-β Estradiol-Lysat: Wachstumsstimulation auf 102 %, Ns.

Tabelle 17 fasst die Ergebnisse zur KRE-Exposition im BrdU-Test zusammen.

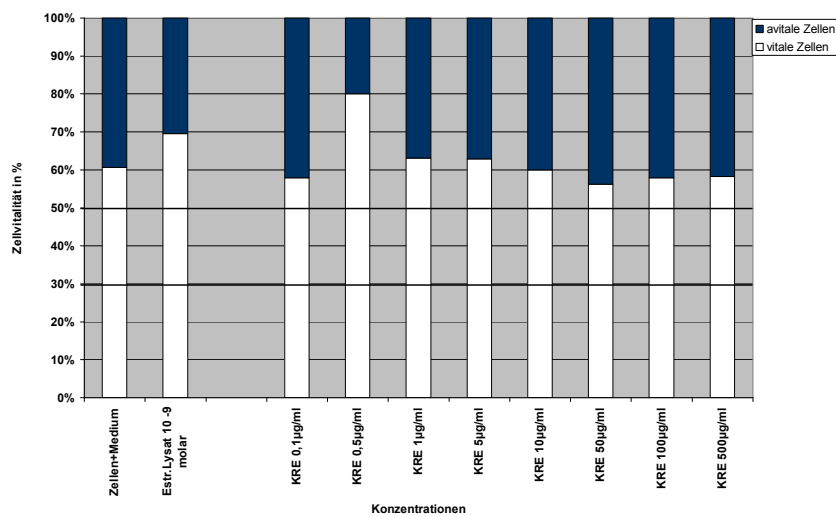
**Tab. 17:** Signifikante Hemmungen und Stimulationen der Zelllinie MCF-7 unter Kürbiskernrohextrakt-Exposition im BrdU-Test.

	17-β Estradiol-Lysat	Signifikante Hemmung hoher Konzentrationen	Weitere signifikante Hemmungen und Stimulationen
<b>Abb. 60</b>	Stimulation, Ns	-	Stimulation: 50 µg/ml*
<b>Abb. 61</b>	Stimulation, Ns	<b>500 µg/ml*</b> <b>Tendenziell signifikant: 100 µg/ml</b>	Stimulation: 10 µg/ml*
<b>Abb. 62</b>	Stimulation, Ns	<b>100, 500 µg/ml*</b>	Stimulation: 5 µg/ml*

Die Ergebnisstatistik des BrdU-Tests bestätigt eine signifikante Wachstumsinhibition der Mammacarcinomzellen der Zelllinie MCF-7 für die Exposition mit hohen KRE-Konzentrationen. Die maximale Hemmung zeigt sich bei der Höchstkonzentration (500 µg/ml). Ebenfalls stellen wir signifikante Wachstumsstimulationen bei Exposition mit mittleren (5, 10 µg/ml), vereinzelt bei niedrigen (0,5 µg/ml) Rohextraktkonzentrationen fest. Die Positivkontrolle bewirkt in allen drei Testreihen nicht signifikante Proliferationssteigerungen.

## Zytotoxizitätstest

Der Anteil vitaler Zellen bewegt sich für die KRE-Konzentrationen überwiegend im Bereich der Vitalität der Negativkontrolle 1 (61 %). Für die Positivkontrolle und die Konzentration 0,5 µg/ml werden höhere Zellvitalitäten (70 % und 80 %) gefunden. Eine Zunahme der avitalen Zellen bei Exposition mit ansteigenden KRE-Konzentrationen kann nicht festgestellt werden. Die minimale Zellvitalität liegt bei 56 %, dies entspricht 92 % der Vitalität der Negativkontrolle 1. Eine  $IC_{50}$  ist somit nicht ermittelbar. Die Wirkung des Rohextraktes und der Lösungsmittel wird als nicht zytotoxisch eingestuft.



**Abb. 63:** Zellvitalität der Zelllinie MCF-7 im Zytotoxizitätstest unter Kürbiskernrohextraktexposition.

## 4. Diskussion

### 4.1 Diskussion der Ergebnisse für die Exposition mit dem Leinsamenrohextrakt

Zellkulturuntersuchungen bilden die Basis zur Erforschung von Wirkung und Wirkmechanismus chemischer und biologischer Substanzen. Bei Studien mit Mammacarcinomzellen werden hierzu häufig die Zelllinien MCF-7 und T47D verwandt. Hinsichtlich der Exposition mit Phytoestrogenen entsteht dabei folgende Kontroverse:

Einige Autoren beobachten eine **Wachstumshemmung** der MCF-7- und T47D-Zellen unter **Lignaneinfluss** (Sesamin aus dem Sesam) [174]. Offenbar wird dieser Effekt über eine Inhibition in der G1-Phase des Zellzyklus mit spezifischer Herabregulation der Expression des Proteins Cyclin D1 realisiert [174]. Ebenso zeigen kürzlich isolierte Lignane verschiedener anderer Pflanzen inhibitorische Effekte auf die Tumorzelllinie MCF-7 [53, 100, 170]. Wang et al. beschreiben tumorhemmende Einflüsse der Säugerlignane Enterolacton und Enterodiol auf die Zelllinie MCF-7 [160].

Andere *in-vitro* Studien belegen für die Zelllinie MCF-7 unter Lignanexposition (7-Hydroxymatairesinol) dagegen eine Zunahme der Zellen in der S-Phase, entsprechend einer **proliferativen estrogenen Wirkung** [42]. Auch das kürzlich entdeckte Lignan Actaealactone entfaltet neben antioxidativer Aktivität offenbar wachstumsstimulierende Effekte auf die Proliferation der Zelllinie MCF-7 [126]. Ebenso beobachten Fokialakis et al. einen proliferativen Einfluss von Secoisolariciresinol auf MCF-7-Zellen [54]. Einer Studie Welshons et al. zufolge stimulieren die phenolischen Lignane Enterolacton und Enterodiol das Wachstum der Zelllinien MCF-7 und T47D [163].

In den letzten Jahren werden für die Zelllinie MCF-7 unter der Exposition mit Lignan ebenfalls **biphasische Effekte** dokumentiert: Niedrige Konzentrationen (10-50  $\mu\text{M}$ : Enterolactone) stimulieren dabei das Tumorwachstum, hohe Konzentrationen (über 50  $\mu\text{M}$ ) wirken dagegen antiproliferativ [161].

Kontrovers gestaltet sich ebenfalls die Frage des Einflusses **anderer Phytoestrogene** wie der Flavone und Isoflavone auf das Proliferationsverhalten von MCF-7 und T47D: Yu et al. beobachten eine **Tumorregression** im Sinne einer Apoptoseinduktion in MCF-7- und T47D-Zellkulturen unter Genistein-Exposition. Tonetti et al. beschreiben lediglich das **Ausbleiben wachstumsstimulierender Effekte** von Isoflavonen (Genistein, Daidzein) an einfachen T47D-Zellkulturen [155]. **Estrogene Effekte** des Phytoestrogens Equol auf das Wachstum von T47D-Zellen können dagegen festgestellt werden [155]. Untersuchungen Seos et al. zufolge stimulieren Genistein und Apigenin die Proliferation von MCF-7 und T47D [143]. Auch einer Studie Brownsons et al. zufolge führt die Exposition mit Genistein und Daidzein bei der Zelllinie T47D zu einer Erhöhung proliferationsfördernder Mechanismen, wohingegen Resveratrol diese hemmt [25]. Ein proliferativer Einfluss des Phytoestrogens Resveratrol auf MCF-7- und T47D-Zellen über die Aktivierung estrogenresponsiver Reporter-Gene wird dagegen von Ghem et al. beschrieben [59]. Auch das Auftreten **biphasischer Effekte** wurde für die Exposition mit Genistein bereits beobachtet: So zeigen Zava et al. für niedrige Konzentrationen (1 nM - 10  $\mu\text{M}$ ) einen stimulierenden Einfluss auf das Tumorwachstum ER-positiver Zelllinien, während hohe Konzentrationen hemmend wirkten [177].

Unsere *in-vitro* Untersuchungen bestätigen die These einer tumorwachstumshemmenden Wirkung hoher Konzentrationen des lignanhaltigen Rohextraktes aus dem Leinsamen. Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden: Unter Exposition mit hohen Konzentrationen (500  $\mu\text{g/ml}$ ; ebenso 100, 150  $\mu\text{g/ml}$ ) des Lignanextraktes aus dem Leinsamen *Linum usitatissimum* wird die Mammacarcinomzelllinie MCF-7 signifikant in ihrer Proliferation gehemmt. Im BrdU-Test wird dabei die maximale Tumorwachstumshemmung z.T. bereits für mittlere Rohextraktkonzentrationen (10, 15, 30

µg/ml) erreicht; auch niedrige Konzentrationen (0,01 µg/ml u.a.) zeigen einen hemmenden Einfluss. Eine klassische Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen LRE-Konzentration und Extinctionswert (als Maß der Tumorphiliferation) ist dabei allerdings nicht erkennbar. Die Extinctionswerte im Diagramm nehmen einen eher kurvenförmigen Verlauf mit Talpunkten (Inhibition) für niedrige, mittlere und hohe Konzentrationen und intermittierenden Peaks (Stimulation). Die beobachteten Wachstumsstimulationen treten im Bereich mittlerer (5 µg/ml) und vereinzelt in höherer (150 µg/ml) Konzentration auf. Durch die Arbeit mit Pflanzenmaterialien treten naturgemäß häufiger Schwankungen in den Untersuchungsergebnissen als bei synthetisierten Materialien auf. Bedingt wird dies durch die Verarbeitung ganzer Pflanzenbestandteile mit unterschiedlicher äußerer (Dicke der Schale, Wachstumsvariabilitäten, evtl. Verschmutzungen etc.) und innerer Konfiguration (verschiedener Anteil an Inhaltsstoffen je nach Wachstumsbedingungen: Licht, Verfügbarkeit von Nährstoffen usw.) und daraus resultierend die Gewinnung einer potenziell inhomogenen Rohextraktmasse. Weitere Bedeutung erlangen eventuelle Rohextraktlösungsschwierigkeiten in den Lösungsmitteln oder Extraktverteilungsschwierigkeiten nach Applikation im well (vgl. 4.6.3 in der Fehleranalyse). Einzelne abweichende Messwerte mögen hierdurch erklärt sein. Begründend für die wiederholt auftretenden Wachstumsstimulationen unter Exposition mittlerer LRE-Konzentrationen ziehen wir dagegen eher das Auftreten biphasischer Wirkeffekte, wie von Wang et al. sowie Zava et al. bereits beschrieben, in Betracht. Demnach führt die Exposition niedriger LRE-Konzentrationen zu stimulierenden Effekten auf die Tumorphiliferation; hohe Konzentrationen hemmen dagegen die Wachstumsrate der Mammacarcinomzellen [161, 177]. Anhand der Zelllinie MCF-7 können wir dies vermuten, jedoch nicht eindeutig belegen.

Für die Zelllinie T47D können wir ebenfalls eine signifikante inhibierende Wirkung des lignanangereicherten LRE (stärkste Ausprägung für hohe Konzentrationen: 300, 500 µg/ml; auch 100, 150 µg/ml) feststellen. Auch mittlere (10, 15, 30 µg/ml) und niedrige (0,01 µg/ml) Konzentrationen zeigen sich - z.T. signifikant - befähigt, die Tumorphiliferation der T47D-Zellen zu hemmen. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung mit zunehmender Hemmung für hohe LRE-Konzentrationen ist lediglich tendenziell zu verzeichnen. Auch hier imponiert ein z.T. kurvenförmiger Verlauf. Ebenfalls für T47D beobachten wir Zellwachstumsstimulationen bei niedrigen (inhomogen) und mittleren (5 µg/ml) Konzentrationen. Wir vermuten auch hier einen Hinweis auf die Existenz biphasischer Wirkeffekte der Lignane auf das Proliferationsverhalten von Mammacarcinomzellen.

Wir gliedern zusätzlich die Mammacarcinomzelllinie HCC-70 in unsere Arbeit ein. Es handelt sich hierbei um eine ER-positive Tumorzelllinie. Bisher wurde HCC-70 nur von wenigen Autoren untersucht, in der Literatur finden sich bis dato keine Studien zu Phytoestrogen-Expositionen.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zu den Zelllinien MCF-7 und T47D gelangen wir zu folgenden Ergebnissen: Der lignanangereicherte LRE ist in der Lage, die Tumorphiliferation der Zelllinie HCC-70 zu hemmen. Insbesondere in hoher Konzentration (500 µg/ml) zeigt sich die proliferationshemmende Wirkung des LRE statistisch signifikant und sehr ausgeprägt. Dies belegen sowohl der MTT- als auch der BrdU-Test. Ebenso führen mittlere (10, 15, 30 µg/ml) und niedrige (0,005 bis 0,1 µg/ml) Rohextraktkonzentrationen zu einer häufig signifikanten Proliferationshemmung. Eine klassische Dosis-Wirkungsbeziehung mit zunehmender Hemmung für hohe LRE-Konzentrationen ist ansatzweise im MTT-Test erkennbar. Vereinzelt beobachten wir des Weiteren signifikante Wachstumsstimulationen im Bereich niedriger Rohextraktkonzentrationen. Ähnlich den Expositionsuntersuchungen der MCF-7- und T47D-Zellkulturen vermuten wir hier einen biphasischen Wirkeffekt des LRE in Abhängigkeit seiner Wirkstoffkonzentration.

Um Hinweise auf ER-unabhängige Wirkmechanismen der Lignane zu erhalten, integrieren wir im Folgenden eine ER-negative Zellreihe, die Zelllinie BT20, in unsere Arbeit. Bisher existieren keine veröffentlichten *in-vitro* Studien zum Einfluss der Lignane auf die Proliferation von BT20. Dagegen beschäftigen sich Ullmannova et al. mit Zellkulturuntersuchungen zum Einfluss einer Flavonexposition auf die Proliferationsrate der Zelllinie BT20. Diese führt zu einer Erhöhung des Tumorsuppressorgenes DLC-1, sowie zur Beeinflussung verschiedener anderer Flavonresponsiver Gene, welche eine Wachstumsinhibition bedingen [157]. Auch nach einer Studie von Cappelletti et al. bewirkt die *in-vitro* Exposition der Zelllinie BT20 mit dem Phytoestrogen Genistein eine Zellwachstumsinhibition, offenbar über eine Heraufregulierung der ER  $\beta$ -Isoformen, welche einem selbstlimitierenden Mechanismus bezüglich der estrogenen Stimulation unterworfen zu sein scheinen [31].

Für andere ER-negative Mammacarcinomzelllinien werden folgende Aussagen getroffen:

Wang et al. beobachten einen inhibierenden Effekt der Lignane (Enterolacton) und Isoflavone in hohen Konzentrationen auf die DNA-Synthese in der ER-negativen Zelllinie MDA-MB-231 [161]. Hierbei erweist sich Enterolacton als schwacher Inhibitor. Eine Stimulation ist für keine Konzentration nachweisbar. Dagegen lässt sich unter Exposition mit den Phytoestrogenen Biochanin A und Flavone eine leichte Stimulation für geringe Konzentrationen (0,01 - 1,0  $\mu$ M bzw. 0,1 - 1,0  $\mu$ M) verzeichnen. Magee et al. bestätigen einen inhibierenden Effekt von Phytoestrogenen aus der Gruppe der Isoflavone und Coumestane auf das invasive Wachstum der ER-negativen Zelllinie MDA-MB-231, hingegen hätten Lignane nur einen minimalen Effekt auf die Invasivität der Zelllinie [108]. Andere Autoren beobachten dagegen lediglich ein Ausbleiben proliferationsstimulierender Effekte der Phytoestrogene Genistein und Apigenin auf die ER- $\alpha$ -negative Zelllinie MDA-MB-435 [143].

Estrogene Aktivität unter der Exposition mit Secoisolariciresinol beobachten Fokialakis et al. an der ER-negativen Zelllinie MDA-MB-231 [54]. Brownson et al. zeigen eine Erhöhung der Phosphorylierung proliferationsaktivierender Kinasen an der Zelllinie MDA-MB-231 unter Exposition mit den Phytoestrogenen Genistein, Daidzein und Resveratrol [25].

In unseren Untersuchungen zur Lignanexposition der ER-negativen Zelllinie BT20 lässt sich eine signifikante Proliferationshemmung bei Höchstkonzentration des LRE (500  $\mu$ g/ml) verzeichnen. Ebenso sind zum Teil niedrige (0,1  $\mu$ g/ml) und mittlere (10, 15  $\mu$ g/ml) Rohextraktkonzentrationen in der Lage, die Proliferationsrate der Tumorzellen zu inhibieren. Eine klassische Dosis-Wirkungs-Beziehung mit zunehmender Hemmung für hohe LRE-Konzentrationen ist dabei ansatzweise erkennbar. Ebenfalls bei der ER-negativen Zelllinie BT20 bewirkt die Exposition mit dem LRE mehrfach z.T. signifikante Wachstumsstimulationen für niedrige (1  $\mu$ g/ml) und mittlere (5  $\mu$ g/ml) Konzentrationen. Auch hier kann ein biphasischer Effekt der Lignane nicht ausgeschlossen werden. Dieser findet sich für ER-negative Zelllinien in der Literatur bisher nicht beschrieben. Unsere Ergebnisse zur ER-negativen Zelllinie BT20 bestätigen die Vermutung, dass bei der proliferationsbeeinflussenden Wirkung der Phytoestrogene neben ER-abhängigen ebenfalls ER-unabhängige Wirkmechanismen in Betracht gezogen werden müssen (vgl. 4.3).

Die Kontroverse um den Einfluss der Lignane auf die Tumorphiliferation von Mammacarcinomzellen lässt sich durch unsere Ergebnisse nicht klären, da sich auch hier Widersprüche verzeichnen lassen. In der Tendenz jedoch bestätigt sich ein inhibierender Effekt des LRE in hohen Extraktkonzentrationen. Des Weiteren ergeben sich Hinweise, welche die Existenz biphasischer Effekte unter steigender Lignanexposition stützen. Niedrige Rohextraktkonzentrationen sind dabei offenbar befähigt, die Proliferation der Mammacarcinomzelllinien MCF-7, T47D, HCC-70 und BT20 zu stimulieren, während hohe Konzentrationen eine Inhibition des Tumorstwachstums hervorrufen. Besonders deutlich lässt



sich dies an der Zelllinie HCC-70 beobachten. In Betrachtung aller Ergebnisse bisheriger *in-vitro* Studien scheint eine endgültige Aussage bezüglich der Wirkung der Lignanextrakte auf das Wachstumsverhalten von Mammacarcinomzellen derzeit nicht möglich zu sein. Weitere Untersuchungen am Zellkulturmodell sind daher notwendig.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse für die Exposition mit dem Kürbiskernrohextrakt**

Trotz des Nachweises seines hohen Gehaltes an Lignanen (vgl. 1.2.1), finden sich in der Literatur bisher nur wenige Untersuchungen zum Kürbiskern. Sicilia et al. beschäftigen sich mit der Analyse der im Kürbiskern (*Cucurbita pepo*) enthaltenen Lignane und identifizieren die Komponenten Secoisolarciresinol und Lariciresinol [147]. Untersuchungen des Einflusses lignanhaltiger Rohextrakte aus dem Kürbiskern auf die Proliferation von Mammacarcinomzellen am Zellkulturmodell existieren in der Literatur bisher nicht.

Die Ergebnisse unserer *in-vitro* Untersuchungen können wie folgt zusammengefasst werden: Unter Exposition mit hohen Konzentrationen (500 µg/ml; 100 µg/ml) des Kürbiskernrohextraktes aus dem Gartenkürbis *Cucurbita pepo* wird die Mammacarcinomzelllinie MCF-7 in ihrer Proliferation statistisch signifikant gehemmt. Mittlere (5, 10 µg/ml) und z.T. auch niedrige Konzentrationen (0,1; 0,5 µg/ml) wirken proliferativ. Deutlicher als für die LRE-Exposition beobachten wir hier eine Dosis-Wirkungs-Beziehung mit biphasischem Verlauf (stimulierende Wirkung in niedriger und inhibitorischer Effekt in hoher Konzentration).

## **4.3 Wirkmechanismen der Phytestrogene**

### **4.3.1 Estrogenrezeptor-abhängige Signaltransduktion**

Überlegungen zur Ursache der Entfaltung proliferativer wie antiproliferativer Wirkeffekte der Lignane auf ER-positive wie ER-negative Zelllinien führen zu Betrachtungen des Wirkmechanismus der Lignane. Der ER-vermittelte Einfluss der Phytoestrogene auf die Zellproliferation stellt in der Literatur den besterforschten Effektmeechanismus dar. Demnach binden Phytoestrogene den ER [176] und üben ihren Einfluss auf die zelluläre Proliferation ER-abhängig [25, 26, 42] und dosisabhängig aus [122]. Es wird angenommen, dass die antiestrogene Wirkung der Phytoestrogene u.a. durch Konkurrenz mit dem endogenen Estradiol am ER erreicht wird [113, 144, 160]. Die Bindungsaffinität der pflanzlichen Estrogene ist dabei etwa 1000fach geringer als die des Estradiols, jedoch können erstere in weitaus höheren Plasmakonzentrationen auftreten.

Unter den Estrogenrezeptoren stellt offenbar der ER  $\beta$  den bevorzugten Bindungsort der Phytoestrogene dar [32, 90, 92, 93, 119], auch wenn grundsätzlich beide Rezeptorsubtypen aktiviert werden können. In der Literatur finden sich Hinweise dafür, dass über den ER  $\beta$  ein inhibierender Einfluss auf ER  $\alpha$ -vermittelte Genexpression ausgeübt und die ER  $\alpha$ -Wirkung opponiert wird [112]. Die funktionellen Aufgabenbereiche beider Rezeptorsubtypen sind letztlich noch nicht vollständig aufgeklärt.

Unterschiede existieren in der Fähigkeit der Phytoestrogene, eine estrogene Aktivität hervorzurufen [176]. So bewirken das Flavon Flavone und das Flavonol Quercetin im Gegensatz zu den biphasischen Effekten anderer Phytoestrogene ausschließlich eine signifikante Wachstumsinhibition in hohen Konzentrationen; Catechin zeigt besagte Inhibition für niedrige Konzentrationen ( $< 0,01 \mu\text{M}$ ) [161]. Das Flavonoid Rutin dagegen erwirkt keine Inhibition, hier wird ausschließlich ein stimulierender Effekt in hohen Konzentrationen ( $> 100 \mu\text{M}$ ) beobachtet [161]. Zava et al. konnten zeigen, dass Flavonoide,

wie z.B. Equol, gute ER-Agonisten und schwache Zellwachstums-Inhibitoren sind. Kaempferol und Quercetin erweisen sich dagegen als schwache ER-Agonisten und potente Wachstumsinhibitoren [177].

Es stellt sich die Frage, ob verschiedene Wirkstoffkomponenten für Stimulation und Inhibition verantwortlich sind, oder ob konzentrationsabhängig verschiedene Effektormechanismen zum Einsatz kommen.

Hinweisführend für einen ER-vermittelten Wirkmechanismus pflanzlicher Estrogene zeigen verschiedene Autoren eine Phytoestrogen-bedingte Induktion des estrogenregulierten Antigens pS2 auf [139, 177]. In Anwesenheit der ER-Antagonisten Tamoxifen [42, 163] bzw. Faslodex (ICI 182 780) [26] kann eine Reduzierung des proliferativen Effektes der Phytoestrogene verzeichnet werden. Kato et al. beschäftigen sich mit der Phosphorylierung des ER als Voraussetzung für die vollständige Aktivierungsmöglichkeit der ligandenunabhängigen Aktivierungsfunktion des ER (AF-1). Diese Phosphorylierung erfolgt *in-vitro* über mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) sowie *in-vivo* über extrazelluläre Signale wie Insulin, IGF, EGF und TGF- $\beta$ . Es resultiert eine Modulation der Rezeptoraktivität durch extrazelluläre Signale in Abwesenheit eines Liganden [83]. Andere Autoren bestätigen die Fähigkeit der Phytoestrogene, ER-abhängig über die Phosphorylierung von Proteinkinasen schnelle nicht-genomische Effekte auszulösen [25, 26]. Beobachtungen einiger Autoren zufolge sind hierbei die ER außerhalb des Zellkerns in der Plasmamembran lokalisiert [85, 98, 148]. Die Aktivierung der Plasmamembranrezeptoren trägt zur Regulierung wichtiger Funktionen wie das Zellwachstum und das Überleben der Zellen, Migration, Angiogenese und Apoptose bei [85, 98].

Einen Erklärungsansatz zur Entfaltung sowohl estrogenen als auch antiestrogenen Wirkeffekte der Lignane bietet die Betrachtung sog. SERMS. Selektive ER-modulierende Substanzen (SERMS) bezeichnen Verbindungen, die an den ER binden und in Abhängigkeit des Zielgewebes sowohl estrogenen als auch antiestrogenen Aktivität entwickeln können [41]. Beispiele für diese Substanzgruppe stellen die Antiestrogene Tamoxifen, Raloxifen oder Faslodex (ICI 182 780) dar. Auch die Lignane werden dieser Gruppe zugerechnet [113].

#### 4.3.2 Estrogenrezeptor-unabhängige Signaltransduktion

Neben den ER-vermittelten scheinen auch ER-unabhängige Wirkmechanismen bei der Signaltransduktion eine bedeutende Rolle zu spielen. Dies lassen die bereits beschriebenen proliferationsfördernden Mechanismen der Phytoestrogene, wie auch die inhibitorische Wirkung hoher Phytoestrogenkonzentrationen auf ER-negative Zelllinien vermuten [25, 161]. Lignane scheinen über die Initiierung schwacher estrogenen wie antiestrogenen Effekte den Metabolismus sowie biologische Effekte der Sexualhormone zu antagonisieren [5, 160]. Zu den bisher bekannten ER-unabhängigen Mechanismen zählt die Induktion der Synthese des Sexhormon-bindenden Globulins (SHBG) in der Leber [8, 160]. SHBG stellt ein Trägerprotein des endogenen Estradiols dar. Durch eine vermehrte Bindung des Estradiols an SHBG sinkt das freie Estradiol. In gebundener Form ist es nicht mehr in der Lage, seine estrogenen Wirkung zu entfalten. Adlercreutz et al. beobachten eine Stimulation der SHBG-Synthese in Lebertumorzellen (HepG2) durch Enterolacton [5].

Erwiesen ist außerdem eine Hemmung der Estrogensynthese in den Microsomen der humanen Plazenta [160] und der Präadipozyten [53, 162] sowie in den Ovarien, den Testes und der Nebennierenrinde durch eine Hemmung der Aromataseaktivität; einem Enzym, welches die Umwandlung von Testosteron in Estradiol katalysiert. Weiterhin liegen Hinweise auf eine Hemmung der 17- $\beta$  - sowie der 3- $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase vor [53].

Als hormonunabhängige Mechanismen werden des Weiteren die Apoptose-Induktion [132, 157, 175] und die antioxidative Aktivität der Phytoestrogene beschrieben [53, 160]. Ebenso

wird eine Hemmung der DNA-Topoisomerase II [110, 128], sowie eine Hemmung der Tyrosinkinasen [10, 58] und Proteinkinase C beobachtet [52].

Einige Autoren belegen eine Hemmung der Angiogenese mit einer daraus resultierenden Inhibierung der Entwicklung und Progression von Tumorerkrankungen, welche mit extensiven Neovaskularisationen verbunden sind [18, 55].

In der Literatur finden sich weitere Hinweise, die für ER-unabhängige Wirkmechanismen der Phytoestrogene sprechen. So zeigen Wang et al. unter Langzeitexposition (10 Tage) niedriger Phytoestrogenkonzentrationen (Genistein) eine kontinuierliche Stimulation der DNA-Synthese. Offenbar im Widerspruch dazu kommt es zeitgleich zu einer Herabregulierung von ER-mRNA, aus welcher jedoch keine Reduzierung des Zellwachstums resultiert. Man vermutet ursächlich hierzu die Existenz eines zusätzlichen ER-unabhängigen Wirkmechanismus, welcher für die Wachstumsstimulation verantwortlich ist [161].

Ramanathan und Gray gehen von der Existenz selektiver phytoestrogenresponsiver Gene aus, und belegen dies für die Zelllinie MCF-7 [133]. Dabei untersuchen sie zwei der identifizierten Gene, PE-13.1 und pRDA-D, auf ihre Herauf- bzw. Herabregulierung durch das Phytoestrogen Genistein. Während Estradiol keine Wirkung auf PE-13.1 zeigt, sind Antiestrogene (ICI 182 780) befähigt, die Phytoestrogeneffekte zu antagonisieren [133]. Demzufolge stellt eine nachgewiesene Wirksamkeit von Antiestrogenen offenbar keinen Nachweis eines ER-abhängigen Mechanismus dar.

#### **4.3.3 Eigene Betrachtungen**

Unsere eigenen Ergebnisse bestätigen durch die nachgewiesene proliferative und antiproliferative LRE-Wirkung auf die ER-negative Zelllinie BT20 die Vermutung ER-unabhängiger Signaltransduktionsmechanismen.

Auffällig in diesem Zusammenhang ist zudem, dass die Zelllinie MCF-7 mit höchster ER- $\alpha$ - (+++) und - $\beta$ -Präsenz (++) im Vergleich zu anderen untersuchten Zelllinien (T47D: ER- $\alpha$ : (++) , ER- $\beta$ : (+); HCC-70: ER- $\alpha$ : (++) , ER- $\beta$ : ((+)) ) unter LRE-Exposition durchaus nicht die zuverlässigste oder stärkste Tumorsuppression bzw. -stimulation zeigt. Auch hier vermuten wir eine Begründung in ER-unabhängigen Signaltransduktionswegen.

Wie unsere Ausführungen zeigen, existieren in der Literatur eine Reihe von Hinweisen zu möglichen Effektormechanismen. Dennoch scheinen die komplexen Abläufe der Wirkungsweise von Phytoestrogenen letztlich noch nicht vollständig aufgeklärt. Es besteht weiterer Forschungsbedarf.

Im Rahmen unserer wissenschaftlichen Arbeit verzichten wir zugunsten der Untersuchung eines weiteren Rohextraktes aus dem Kürbissamen auf die weiterführende Erforschung möglicher Signaltransduktionswege.

#### **4.4 Proliferativ-wirksame Substanzen im Leinsamenrohextrakt**

Oder: Welche Komponente des LRE verursacht die beobachteten Effekte?

In den Expositionsuntersuchungen an unseren Zellkulturen verwenden wir ein aus dem Leinsamen extrahiertes lignanhaltiges heterogenes Stoffgemisch. Auf diese Weise kann der Effekt einer phytoestrogenhaltigen Diät mit der Vielfalt all ihrer wirksamen Bestandteile und der möglichen Wechselwirkungen von Extraktkomponenten untereinander praxisnah nachempfunden werden. Allerdings führt dies auch zu der Überlegung, welcher Bestandteil des lignanangereicherten Rohextraktes für die estrogenen bzw. antiestrogenen Wirkungen verantwortlich gemacht kann.

Die Frage, ob die Proliferationssteigerung im estrogenen Zielgewebe als Effekte einer Estrogenwirkung anzusehen ist, wird von vielen Autoren bejaht. Nach Sonnenschein und Soto kann eine Substanz aufgrund proliferativer Effekte als estrogenartig beurteilt werden [151]. Hewitt et al. sehen eine erhöhte zelluläre Proliferation als eine „Spätreaktion“ der ER-vermittelten Estrogenwirkung an [69]. Diesen Aussagen zufolge ließen sich die in unserer *in-vitro* Studie erzeugten proliferativen Effekte potenziell estrogenartig wirksamen Substanzen des LRE - wie beispielsweise den Lignan - prinzipiell zuordnen.

Zudem finden sich estrogenartige Wirkeffekte der Lignane in der Literatur bereits beschrieben. So konnte eine Induktion des estrogenabhängigen Proteins pS2 durch Enterolacton bereits nachgewiesen werden [5, 139].

Es stellt sich die Frage, ob potenziell estrogenartige Substanzen aus dem LRE ebenfalls für die beobachteten antiproliferativen Effekte verantwortlich sind. Auch dieser Lignaneffekt findet sich in der Literatur *in vitro* wie *in vivo* bereits belegt (vgl. 4.1 bzw. 1.1.3).

Für die antiestrogene Wirkung kommen jedoch ebenso andere Extraktkomponenten des LRE in Frage. Johnston et al. zeigen, dass das Öl des Leinsamens sowie die anteilig am größten vertretene Fettsäure,  $\alpha$ -Linolenic-Säure, in der Lage sind, das Tumorstadium zu hemmen. Demzufolge könne die Schlussfolgerung, die antitumoröse Wirkung des Leinsamens sei vorwiegend durch dessen Lignananteil bedingt, nicht zweifelsfrei gezogen werden [82]. Zur Reduzierung des Einflusses von Fettsäuren führen wir daher initial eine Extraktentfettung durch. Dieses Vorgehen wurde bereits von anderen Autoren praktiziert [135]. Dennoch sind in unserer Studie Fettsäuren in der Analyse des Rohextraktes nachweisbar (vgl. 3.3).

Trotz der Schwierigkeiten bei der Ermittlung des wirksamen LRE-Inhaltsstoffes bzw. der Kombination mehrerer wirksamer Inhaltsstoffe, sprechen viele Überlegungen FÜR die Verwendung des Rohextraktes anstelle eines isolierten Lignans. Rickard et al. beobachten, dass der Urinspiegel der Säugerlignane nach Leinsamenaufnahme sehr viel höher ausfällt als nach Aufnahme von Secoisolariciresinol [135]. Dies belegt, dass neben einzelnen Precursorlignan (wie dem als hauptsächlich wirksam identifizierten Secoisolariciresinol [16]) eine Reihe weiterer Precursor im Leinsamen existieren. Ebenfalls zeigen Rickard et al., dass isoliertes Secoisolariciresinol anders metabolisiert wird als im Extrakt gebundenes Secoisolariciresinol [135]. Auch dies spricht für die Notwendigkeit der Untersuchung von Rohextrakten. Für das von Rickard et al. verwendete Secoisolariciresinol wurde eine niedrige Wiederfindung verzeichnet, hinweisend auf eine inkomplette bakterielle Hydrolyse des Secoisolariciresinols, auf eine Metabolisierung zu anderen Stoffwechselprodukten als Enterolacton und Enterodiol, oder auf eine Metabolisierung von Enterolacton und Enterodiol zu anderen Produkten [135], welche in der *in-vitro*-Testung einzelner Substanzen nicht erfasst werden würden. Die Verwendung des Rohextraktes erschließt zudem die Möglichkeit der Betrachtung der Wirkung der ursprünglichen Lignane, welche in der Annahme einer kompletten Metabolisierung in Säugerlignane und andere Metabolite häufig außer Acht gelassen wird. Rickard et al. weisen das Vorkommen unmetabolisierter Lignane (Secoisolariciresinol) im Urin der Ratten nach [135].

#### 4.5 Die Stimulation mit 17- $\beta$ -Estradiol

Erwartungsgemäß führen unsere Stimulationsreihen mit 17- $\beta$ -Estradiol (im Sinne einer Positivkontrolle) bei Exposition mit den ER-negativen Zelllinien zu keiner signifikanten Stimulation. Unterschiede zeigen sich bei der Exposition mit den ER-positiven Zelllinien, bei welchen 17- $\beta$ -Estradiol zwar überwiegend eine Proliferationssteigerung bewirkt, diese jedoch z.T. nicht oder lediglich tendenziell signifikant war.

Ursächlich hierfür kommen diverse Erklärungsansätze in Betracht. Zum einen ist es denkbar, dass Verteilungsschwierigkeiten des Estradiol-Lysates bzw. dessen Lösung,

Aufbewahrungsbedingungen oder Alter (vgl. 4.6.3 Punkt 7) Abweichungen in der Wirkung verursachen. Möglich wäre sowohl eine nicht-proliferativ wirksame sehr niedrige Effektivkonzentration des Estradiols in der Zellkultur, wie auch eine zytotoxisch wirksame sehr hohe Effektivkonzentration [134]. Letztere wird in unseren Untersuchungen durch den Zytotoxizitätstest ausgeschlossen. Makroskopisch sind keine Ausfällung oder Verschmutzungen des gelösten Estradiols erkennbar. Die Aufbewahrung des Estradiols erfolgt gekühlt und unter Lichtschutz.

Auch ein mikrobieller Befall der Zellkultur kann eine veränderte Estrogenantwort hervorrufen. So zeigen Paruthiyil et al. eine Adenovirus-induzierte Expression von ER- $\beta$  in MCF-7 Zellen, welche auf diese Weise den Phänotyp dieser Zelllinie verändert. Es resultiert eine verminderte Estrogenresponsivität der MCF-7 Zellen [129]. In unseren Untersuchungen erfolgt eine mikroskopische Beurteilung der Zellkulturen an jedem zweiten Tag. Mikrobielle Veränderungen der Testzellen sind nicht sichtbar. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgt unter Penicillin-, Streptomycin und Amphotericin-B-Zusatz (vgl. 2.2.1).

Weiterhin sind Tumorzellen in ihrer Eigenschaft als entdifferenzierte Zellen häufiger Mutationen unterworfen. Conway et al. weisen in einer Fall-Kontroll-Studie die Präsenz einer Punktmutation im ER- $\alpha$ -Genom nach (5,7 % aller untersuchten Brusttumoren), welche zu einer Hypersensibilität bezüglich des Estrogens führt [39]. Diese Mutation zeigt sich häufig mit Tumoren höhergradiger Aggressivität assoziiert. Auch Mutationen mit resultierender Hyposensibilität bezüglich der Estrogenwirkung sind denkbar. Eine Punktmutation wird in den immunologischen Untersuchungen bezüglich des ER-Status der Zelllinien nicht erfasst. Möglich wäre folglich ein funktionsveränderter ER mit einer völlig unauffälligen ER-Analyse. Nach Hossain et al. verursacht die Herabregulation der Expression einer spezifischen mRNA (AIB1: amplified in breast cancer 1) durch eine bestimmte Micro-mRNA (Mir-17-5p) eine verminderte ER-abhängige Genexpression und Proliferation [75]. Die Bedeutung dieser Entdeckungen ist noch nicht geklärt. Zahlreiche Faktoren, die Einfluss auf Proliferation und Estrogenantwort einer ER-positiven Zelllinie nehmen, sind in der Literatur bereits bekannt (TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ -Tocopherol, extrazelluläre Matrix-Proteine, IGF-1, EGF, Vorbehandlung der Zellen mit Actinomycin D oder Cycloheximid) [35, 50, 123, 166]. Obwohl Präsenz und Einfluss der genannten Faktoren in unserer *in-vitro*-Kultur fraglich sind, ist die Existenz weiterer, im Zellkulturmodell relevanter Faktoren nicht auszuschließen. Auch für Antiestrogene ist die Entwicklung einer Resistenz bekannt. Aktuell wurden bereits zehn Brustkrebs-Antiestrogen-Resistenz(BCAR) - Genloci identifiziert [48].

Durch den großen Umfang der Erklärungsmöglichkeiten und den großen Aufwand der Analyse der einflussnehmenden Faktoren kann die zugrunde liegende Ursache für die Unterschiede in der 17- $\beta$ -Estradiol-Stimulation im Rahmen unserer Untersuchungen nur vermutet werden. Mit einer nur tendenziell signifikanten, nicht signifikanten oder ausbleibenden Stimulation durch die Positivkontrolle finden sich typischerweise keine auffällig abweichende Stimulation bzw. Inhibierung durch den Rohextrakt assoziiert. Dies mag auf einen Kausalzusammenhang mit dem verwendeten Estradiol-Lysat hinweisen, kann aber auch durch einen ER-unabhängigen Wirkmechanismus der Phytoestrogene bedingt sein.

## **4.6 Methodische Aspekte**

### **4.6.1 Methoden der immunhistochemischen Untersuchungen**

Zur Analysierung des Estrogenrezeptorstatus der im Experiment verwendeten Mammacarcinomzelllinien setzen wir die Avidinkomplexmethode, anfänglich mit dem Reaktionssubstrat Diaminobenzidin (DAB) ein. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wird das Reaktionssubstrat durch HistoGreen ersetzt. Grund für den Methodenwechsel ist die

während des langen Untersuchungszeitraumes festgestellte Cancerogenität des ursprünglich verwendeten Substrates DAB. Hinzu kommen im Versuchszeitraum entwickelte molekularbiologische Neuerungen. Dabei kann mit Einführung des HistoGreen Reaktionssubstrates eine Ökonomisierung der letzten Schritte des Testablaufes realisiert werden. Die Vergleichbarkeit beider Verfahren zur Bestimmung des ER-Status wird durch die Verwendung derselben Testmethodik gewährleistet.

#### **4.6.2 Unterschiede in MTT- und BrdU-Test**

Der Vergleich der MTT- und BrdU-Testreihen erbringt in unseren Versuchsansätzen zum Teil abweichende Ergebnisse. Die Ursache hierfür vermuten wir in den unterschiedlichen Ansatzpunkten beider Tests: Während der MTT-Test über die Tätigkeit eines mitochondrialen Enzyms der Atmungskette (der Succinat-Dehydrogenase) eine Aussage über die Stoffwechselaktivität der untersuchten Zellen trifft (2.2.5.2), gibt der BrdU-Test über den Einbau von 5-Bromo-2'-deoxy-Uridine in die Zell-DNA Aufschluss über die DNA-Neusynthese-Rate der Tumorzellen (2.2.5.2). Je nach vermutetem Wirkmechanismus der Phytoestrogene müssen die Ergebnisse beider Untersuchungen nicht stets miteinander korrelieren: Liegt dem inhibitorischen Effekt des Lignanextraktes beispielsweise eine Apoptoseinduktion zugrunde, so wird dieser sog. programmierte Zelltod aktiv durch die Bildung eines DNA-zerschneidenden Enzyms, welches die DNA des Zellkerns zerstört, initialisiert [21]. Die Zelle muss vorher nicht notwendigerweise mit einer Reduzierung ihrer Stoffwechselaktivität reagiert haben. Bei einem ER-abhängigen proliferativen Lignaneffekt andererseits, welcher sich in einem Eintritt der Zelle in die Synthesephase (S-Phase) reflektiert, beobachtet man initial eine verstärkte Replikation der DNA [21] (erhöhte Extinctionsmesswerte im BrdU-Test). Erst versetzt beginnt die Produktion der zur zellulären Teilung benötigten Proteine (Erhöhung der mitochondrialen Aktivität - erhöhte Extinctionsmesswerte im MTT-Test). In beiden beschriebenen Fällen führen ein zeitgleich vorgenommener MTT- und BrdU-Test zu nicht einheitlichen Ergebnissen.

Solakidi et al. beschreiben, neben dem Nachweis von ER- $\alpha$  im Zellkern, eine zusätzliche diffuse ER- $\alpha$ -Anfärbung im Zytoplasma. Insbesondere kann ER- $\beta$  verstärkt in der Mitochondrien-Membran lokalisiert werden. Dieses Ergebnis lässt einen direkten Einfluss von Steroidhormonen auf die Funktion der Mitochondrien vermuten [150], und findet Bestätigung in den Untersuchungen anderer Autoren [36, 141]. Eine unterschiedliche Ergebnisfindung in MTT- und BrdU-Test wäre auch hierdurch erklärt.

Die mitochondriale Funktion ist zudem dem Einfluss zahlreicher Faktoren unterworfen. So sind ein relativer Sauerstoffmangel oder Fremdstoffe in der Lage, über eine direkte Schädigung der Atmungskettenkomplexe die Mitochondrienaktivität zu reduzieren. Ineffiziente Fehlererkennungs- und Reparaturmechanismen sowie der Einfluss von Sauerstoffradikalen aus der Atmungskette resultieren in einer 10- bis 20-fach erhöhten Mutationsrate der mitochondrialen DNA. Auch dies mag abweichende Extinctionswerte im MTT-Test bedingen.

#### **4.6.3 Fehleranalyse**

Insbesondere der BrdU-Test zeigt für bestimmte Zelllinien eine starke Schwankungsbreite innerhalb der Viererwertbestimmung eines Messwertes. Diese resultiert in einer hohen Standardabweichung und beeinflusst die Auswahl des Verfahrens der statistischen Auswertung (vgl. 2.2.6). Aufgrund dessen nehmen wir eine Analyse der Einflussfaktoren auf

den BrdU-Test vor, um auf diese Weise die weiteren Versuchsreihen besser zu standardisieren und mögliche Ursachen für die Schwankungen im Test aufklären zu können. Nachfolgende Tabelle enthält eine Übersicht über mögliche Einflussfaktoren.

**Tab. 18:** Auf den BrdU-Test einflussnehmende Faktoren

1. Zellkultur	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Unterschiede in der Zellpassage</b> (Verlust von Rezeptoren, Mutationen)</li> <li>- <b>mikrobieller Befall der Zelllinie</b></li> </ul>
2. Zellaussaat	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Zellstress</b> (langer Trypsinkontakt, Stehen unter nicht-humidifizierten Bedingungen, Licht)</li> <li>- <b>Unterschiede in der Zellzahl pro well</b> (zufällige Zellverklumpungen; Zuggenauigkeit der Pipetten)</li> <li>- <b>Gelegenheit zur Zelladhärenz</b> (längere Arbeitspausen)</li> <li>- <b>ungleichmäßiges Anwachsen</b> der Zellen (Lagerung der Mikrotiterplatte im Brutschrank)</li> <li>- veränderte Zellreaktion durch atmosphärischen Abschluss im well</li> </ul>
3. Extrakt	<ul style="list-style-type: none"> <li>- verschiedene Möglichkeiten der Extraktpipettierung: <ul style="list-style-type: none"> <li>- an die Wand des wells</li> <li>- direkt ins Medium</li> <li>- mit/ ohne nochmaligen spülenden Pipettenaufzug</li> <li>- Menge des pipettierten Extraktes: 1 µl vs. 10 µl (bei konstanter Endkonzentration)</li> </ul> </li> <li>- <b>Verteilungsschwierigkeiten des Extraktes</b> in der Zellsuspension</li> <li>- <b>Lösung des Extraktes:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- in Ethanol</li> <li>- in Ethanol + PBS</li> <li>- in DMSO</li> </ul> </li> <li>- unterschiedliches <b>Alter der Extrakte</b> (Halbwertszeiten der Extraktkomponenten)</li> <li>- Lagerung der Extrakte: (gekühlte Extrakte vs. gefrorene Extrakte; Lichtexposition)</li> </ul>
4. BrdU Kit	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Öffnungsdatum des BrdU Kits</b> (Zeitdauer der Kühlschranklagerung; Anzahl der Einfrier- und Auftauvorgänge)</li> <li>- <b>Zustand des BrdU Kits</b> (Verschluss der Flaschen; Verschmutzung des Flascheninhaltes)</li> <li>- <b>Licht- und Wärmeexposition des BrdU Kits</b></li> </ul>
5. Testvorgang	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Ansatz der BrdU - Lösungen in (sterilen) Röhrchen</b> vs. Ansatz in der Pipettierwanne</li> <li>- Sauberkeit/ Keimarmut der Pipettierwannen (Vorabreinigung; Reste von Wasser oder Desinfektionsmitteln)</li> <li>- <b>Art des Pipettierens:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Genauigkeit</li> <li>- Ausstoss an die Wand des wells/ zentral</li> <li>- starker vs. schwacher Sog bzw. Ausstoss der Pipette</li> <li>- Kratzen am Wellboden durch Pipettenspitze</li> </ul> </li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Art und Weise des Ausklopfens: <ul style="list-style-type: none"> <li>- vor Fixative: mögliche Beschädigung des Zellrasens</li> <li>- nach Fixative: evtl. unvollständiges Ausklopfen der Lösungsreste</li> </ul> </li> <li>- Ablauf des Testverfahrens mit Unterbrechung durch Einfrierung nach Fixative vs. Ablauf ohne Unterbrechung <ul style="list-style-type: none"> <li>- Zeitdauer der gefrorenen Lagerung</li> </ul> </li> <li>- Variationen in der Peroxidase - Inkubationszeit bis zum ELISA</li> <li>- <b>Luftblasen</b> (Einfluss auf die ELISA Extinction)</li> </ul>
6. Umgebungsbedingungen	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Licht; Temperatur</li> <li>- Luftfeuchtigkeit; Luftdruck</li> <li>- Arbeit unter Sterilbox vs. freie Arbeit im Labor</li> <li>- Oberflächenbeschaffenheit (Staub, etc)</li> </ul>
7. Estradiol	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Lösung des Estradiols</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- in Ethanol</li> <li>- in Ethanol + PBS</li> <li>- in DMSO</li> <li>- in Wasser</li> </ul> </li> <li>- Estradiol - Stammlösung <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alter der Stammlösung</li> <li>- Aufbewahrungsbedingungen (Lichtexposition, Temperatur)</li> <li>- Verschmutzungen</li> </ul> </li> <li>- <b>Ausfällung</b> des zuvor gelösten Estradiols</li> <li>- unterschiedliche Pipettiervolumina: 1 µl vs. 10 µl (bei konstanter Endkonzentration)</li> </ul>

Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, existieren eine Reihe systematischer und zufälliger Fehlerquellen, welche das Ergebnis des BrdU-Testes beeinflussen und in Abweichungen der Messwerte resultieren können.

Auswirkungen von exogenen Einflüssen sind von Aune und Pogue bereits beschrieben. In einer Studie weisen sie die Negierung des wachstumsinhibierenden Effektes von Interferon  $\gamma$  bei reduzierter Sauerstoffverfügbarkeit *in-vitro* nach [15]. Ähnliche Untersuchungen zur Auswirkung exogener Einflüsse in Verbindung mit Wirkeffekten der Phytoestrogene am Zellkulturmodell *in-vitro* existieren derzeit in der Literatur noch nicht. Es ist daher wichtig, sich möglicher, aktuell noch unerforschter Einflussfaktoren bewusst zu werden und diese im Experiment auf ein Mindestmaß zu beschränken.

#### 4.7 Die Frage der relevanten Konzentrationen

Oder: Wieviel Esslöffel Leinsamen muss eine Frau zu sich nehmen, um eine antiproliferativ wirksame LRE-Konzentration in ihrem Blut zu erreichen? Dazu eine arithmetische Herleitung:

In der biologischen Herstellung können aus 40 g Leinsamen 23 g entfettetes Leinsamenmehl hergestellt werden. 20 g dieses Samenmehls werden zu einer Menge von 138,1 mg Rohextrakt weiterverarbeitet. Die übrigen 3 g ergäben theoretisch noch einen zusätzlichen Gewinn von 20,7 mg, in der Summe 158,8 mg Rohextrakt.

Die im Experiment eingesetzte Höchstkonzentration von 500 µg auf 1 ml soll nun im menschlichen Blut erreicht werden. Wir gehen von einem durchschnittlichen Blutvolumen



von 5 l (entsprechend 5000 ml) Blut aus. Multipliziert mit dem Faktor 5000 wird folglich eine Menge von 2500 mg des Rohextraktes benötigt, um eine Konzentration von 500 µg/ml zu bewerkstelligen. Die errechneten **2500 mg** Rohextrakt entsprächen etwa der 15,7-fachen Menge unseres hergestellten LRE; benötigt würden also 628 g Leinsamen. Auf die Praxis bezogen entspräche dies in etwa der Anzahl von ca. 63 gehäuften Esslöffeln Leinsamen.

In der Literatur finden sich Angaben für die durchschnittliche tägliche Phytoestrogenaufnahme zwischen **50 und 200 mg** in traditioneller japanischer Diät [11, 27], selbst bei sehr hoher Phytoestrogenaufnahme also lediglich knapp 10 % der im Test zuverlässig antiproliferativ wirksamen Konzentration. In den Ländern der westlichen Welt liegt die tägliche Aufnahme mit einer Menge von durchschnittlich **1 mg** Phytoestrogene noch deutlich niedriger [116]. Allerdings beziehen sich diese Angaben auf Phytoestrogene in Reinform; in unserem Experiment handelt es sich dagegen um ein Stoffgemisch aus verschiedenen Extraktkomponenten (vgl. 3.3).

Unser errechnetes theoretisches Konstrukt setzt die tatsächliche Verfügbarkeit der ermittelten Extraktmenge im Blutvolumen voraus. Dies entspräche einer i.v.-Gabe des Rohextraktes. Bei oraler Einnahme der berechneten Menge Leinsamen muss der Metabolismus des menschlichen Körpers einkalkuliert werden. Dieser verändert die tatsächlich im Blut verfügbare Konzentration an LRE durch Verstoffwechselung in der Darmflora, Abbau und Umwandlung im Organismus, durch das Auftreten aktiver Metabolite; sowie durch die Ausscheidung mit bestimmter Halbwertszeit und Wiedereintritt in den enterohepatischen Kreislauf (vgl. 1.2.3). Dabei unterliegt der Metabolismus des Leinsamens im menschlichen Körper breiten interindividuellen Schwankungen. Eine weitere Variable bildet die durch Kumulation tatsächlich erreichte Konzentration der Lignane im Zielgewebe.

Aus den Ausführungen wird ersichtlich, dass sich die Beantwortung der Frage nach der Übertragbarkeit *in-vivo* äußerst schwierig gestaltet. Die ermittelten 63 Esslöffel Leinsamen können nicht ohne weiteres für die orale Einnahme in die Praxis übernommen werden.

Zur Herstellung eines Praxisbezuges würden Studien zur Dokumentation der im Blut erscheinenden LRE-Wirkstoffkonzentration nach Konsum einer definierten Menge an Leinsamen benötigt. Ebenso müsste eine Ermittlung der LRE-Konzentration im Zielgewebe erfolgen. Insbesondere letztere gestaltet sich in ihrer praktischen Ausführung problematisch.

#### **4.8 Empfehlungen zur Einnahme von Leinsamen und Kürbiskern**

Eine allgemeingültige Empfehlung zur Einnahme von Leinsamen und Kürbiskern erweist sich als schwierig.

Wie die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen, sind hohe Wirkstoffkonzentrationen von Leinsamen und Kürbiskern in der Lage, das Tumorwachstum verschiedener ER-positiver und -negativer Mammacarcinomzellen statistisch signifikant zu hemmen. Dies wird für den Leinsamen durch andere Studien in der Literatur bestätigt (vgl. 4.1).

Dagegen steht die Frage nach der potenziellen Gefahr einer Tumorwachstumsstimulation bei Exposition mit niedriger oder mittlerer Wirkstoffkonzentration, welche wiederholt und zum Teil statistisch signifikant nachweisbar ist. Auch diese kann in früheren Studien bereits nachgewiesen werden (vgl. 4.1).

Das Gefahrenpotenzial scheint durch den Einfluss zahlreicher zusätzlicher Faktoren (Zeitpunkt und Kontinuität der Phytoestrogenaufnahme [2, 145]) bestimmt und interindividuell sehr unterschiedlich zu sein. In der Literatur finden sich Hinweise auf einen tumorpräventiven Effekt der Phytoestrogene (Soja, Leinsamen) bei deren Konsumierung neonatal, präpubertär oder in der Adoleszenz [2, 20, 146, 158], während sich eine gleichartige Wirkung bei späterer Aufnahme nicht verfolgen lässt [74, 84, 86]. Ursächlich hierfür ist

möglicherweise ein Einfluss der Lignane auf eine frühe Differenzierung der weiblichen Brustdrüse [156]. Dieser Mechanismus ist bisher noch nicht vollständig verstanden.

Nach einer prospektiven Studie zum Einfluss von Phytoestrogenen (Soja) auf histologisch normales Brustdrüsengewebe prämenopausaler Frauen scheinen die pflanzlichen Estrogene nach kurzzeitig erhöhtem Konsum die Proliferation gesunden Brustdrüsengewebes signifikant zu stimulieren [114]. Wang et al. beobachten - nach primärer Inhibition - einen Rebound in der DNA-Synthese mit erneuter Erhöhung der Syntheserate nach Beendigung einer kurzzeitigen Exposition mit hohen Genisteinkonzentrationen [177]. Bei langandauernder Phytoestrogeneinnahme (Soja) verändert sich der Metabolismus offenbar [104]. Hier werden herabgesetzte Phytoestrogenlevel im Urin sowie eine niedrigere Gesamtausscheidung beobachtet. Man vermutet eine schnellere Absorption, eine schnellere Ausscheidung und einen veränderten Metabolismus der verdauten Isoflavone [104].

Offen bleibt die Frage, welche Wirkstoffkonzentration im einzelnen Individuum nach Konsum einer definierten Menge Leinsamens tatsächlich vorliegen. Nach Zava und Duwe variieren physiologisch erreichbare Phytoestrogen-Plasmakonzentrationen um die 10 nM - 20  $\mu$ M [177]. In diesem Wirkungsbereich zeige Genistein potente estrogenagonistische (1 nM bis 10  $\mu$ M) und tumorzellwachstumshemmende (über 10  $\mu$ M) Effekte [177]. Adlercreutz et al. sowie Xu et al. berichten über physiologische Plasmakonzentrationen durchschnittlich unter 10  $\mu$ M, bzw. sogar überwiegend unter 1  $\mu$ M [4, 171, 172]. Dadurch sei es möglich, dass Phytoestrogene in physiologischen Konzentrationen das Tumorwachstum ER-abhängiger Tumore eher stimulieren, anstatt eine Hemmung zu erwirken [161]. Ausführungen von Moutsatsou et al. bestätigen, dass die Einnahme von Phytoestrogenen in einigen Fällen das Erkrankungsrisiko für das Mammacarcinom erhöhen kann [122]. Auch Seo et al. kommen zu dem Schluss, dass die Einnahme von Phytoestrogenen (Isoflavone) durch die Fähigkeit zur Stimulation des Brustzellwachstums bei postmenopausalen Frauen schädlich sein könne. Zusätzlich antagonisiere eine Isoflavon-Einnahme bei Frauen mit Brustkrebs unter Behandlung mit Tamoxifen dessen antiproliferative Effekte [143]. Nach Strauss et al. treten ebenso die ER-unabhängigen antitumorigenen Phytoestrogen-Effekte (vgl. 4.3.2) erst in sehr hohen Konzentrationen auf, welche physiologischerweise kaum erreicht werden [153].

Dass die Phytoestrogenlevel durch eine erhöhte Aufnahme nicht endlos zu steigern sind, zeigen Rickard et al. im Tierexperiment bei Ratten. Nach primärem linearen Anstieg des Urinlevels der Säugerlignane (unter Leinsamendiät bis anteilig 5 % bzw. unter Einnahme von Secoisolariciresinol bis 2,2  $\mu$ mol) beobachten sie im Folgenden eine Plateaubildung [135]. Da die Urinlevel der Lignane Indikatoren für die Lignanproduktion im Kolon darstellen, ergibt sich hieraus die Frage der praktischen Relevanz der Testung höherer Lignandosen in Tumorigenesestudien [135].

Nach wie vor scheint die Frage eines präventiven Effektes oder potenzieller Gefahr der Carcinomtriggerung bei Konsumierung pflanzlicher Estrogene umstritten zu sein [4, 115, 122, 143]. Eine Auswertung bisher veröffentlichter Studien zum Einfluss von Phytoestrogenen auf das Risiko der Brustkrebsentwicklung lässt eine eindeutige Aussage hinsichtlich einer generellen Empfehlung bezüglich der Einnahme von Phytoestrogenen nicht zu [60].

Bis zur Klärung der Relevanz der Proliferationsstimulationen von lignanhaltigen Pflanzenrohextrakten in niedrigen und mittleren Konzentrationen raten wir von einer schlagartigen Diätänderung mit Einnahme hoher Mengen an Leinamen und Kürbiskern bzw. ihrer Rohextrakte ab. Kleinere Mengen an Leinsamen und Kürbis scheinen durch den geringen Aufbau eines Wirkstoffspiegels dagegen nach wie vor unbedenklich. Hier stehen positive gesundheitliche Aspekte des Leinsamens (wie beispielsweise die stuhlregulierende Wirkung oder die Anwendung bei Reizungen und Entzündungen der Schleimhäute von Magen und Darm) bzw. des Kürbis (Stärkung des Immunsystems, Förderung der Verdauung

sowie die Anwendung bei Blasenschwäche) im Vordergrund [56]. Ebenso scheint ein permanenter seit der Adoleszenz bestehender hoher Phytoestrogenkonsum unschädlich. Die Betrachtung aller Aspekte führt zu der Empfehlung einer balancierten Diät mit - statt einer abrupten Gewichtung auf lignanhaltige Pflanzen oder Pflanzenextrakte - einer großen Vielfalt an Früchten und Gemüsen, welche Soja und Vollkornprodukte enthalten [41].

#### 4.9 Ausblick

Das aus dieser Arbeit abgeleitete Interesse gilt der medizinischen Anwendung des Rohextraktes. Durch seine Fähigkeit zur Tumorsuppression in hoher Konzentration stellt der LRE sowie der KRE eine potenzielle Möglichkeit der adjuvanten Chemotherapie bzw. postoperativen Nachsorge ER-positiver Mammacarcinome dar. Durch seine gleichsam proliferationshemmende Wirkung auf ER-negative Mammacarcinomzelllinien, könnte der LRE bzw. KRE in hoher Konzentration darüber hinaus prinzipiell auch bei der adjuvanten chemotherapeutischen Behandlung ER-negativer Mammacarcinome zum Einsatz kommen. Coradini et al. stellen bereits fest, dass auch Antiestrogene (ICI 164 384) eine antiproliferative Wirkung auf ER-negative Zelllinien ausüben, vermutlich über alternative, nicht ER-regulierte Mechanismen [40]. Das Potential von Phytoestrogenen als effektives Adjuvans in der Chemotherapie zur Prävention von Brustkrebs und Brustkrebsmetastasen wird bereits klinisch diskutiert [101, 157].

Um dieses Potenzial in der medizinischen Anwendung nutzen zu können, sollten daher die vorliegenden Ergebnisse durch weitere Untersuchungen zur Wirkung von Phytoestrogenen auf Mammacarcinomzellen *in-vitro* sowie *in-vivo* verifiziert werden und nachfolgend die Diskussion über den Einsatz von Phytoestrogenen zur adjuvanten Chemotherapie bzw. postoperativen Nachsorge für hormonabhängige wie auch -unabhängige Mammacarcinome vorangetrieben werden.

## 5. Literaturverzeichnis

- 1 Adami, -H-O: Breast cancer incidence and mortality. Aspects on aetiology, time trends and curability. *Acta-Chir-Scand-Suppl.* 1984; 519: 9-14.
- 2 Adlercreutz, -H: Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet-Oncol.* 2002 Jun; 3(6): 364-73.
- 3 Adlercreutz, -H: Evolution, nutrition, intestinal microflora and prevention of cancer: a hypothesis. *Proc-Soc-Exp-Biol-Med.* 1998; 217: 241-46.
- 4 Adlercreutz, -C-H-T; Godin, -B-R; Gorbach, -S-L; Höckerstedt, -K-A-V; Watanabe, -S; Hämäläinen, -E-K; Hase, -T-A; Fotsis, -T: Soybean intake and cancer risk. *J-Nutr.* 1995; 125: 757S-770S.
- 5 Adlercreutz, -H; Mousavi, -Y; Clark, -J; Höckerstedt, -K; Hamalainen, -E; Wahala, -K; Makela, -T; Hase, -T: Dietary phytoestrogens and cancer: in vitro and in vivo studies. *J-Steroid-Biochem-Mol-Biol.* 1992; 41: 331-337.
- 6 Adlercreutz, -H: Western Diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand-J-Clin-Lab-Invest-Suppl.* 1990; 201: 3-23.
- 7 Adlercreutz, -H; Höckerstedt, -K; Bannwart, -C; Hamalainen, -E; Fotsis, -T et al.: Association between dietary fiber, urinary excretion of lignans and isoflavonic phytoestrogens and plasma-protein bound sex hormone in relation to breast cancer. *Progress-Cancer-Res-Ther.* 1988; 35: 409-12.
- 8 Adlercreutz, -H; Höckerstedt, -K; Bannwart, -C; Bloigu, -S; Hamalainen, -E; Fotsis, -T; Ollus, -A: Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHGB). *J-Steroid-Biochem.* 1987; 27(4-6): 1135-44.
- 9 Adlercreutz, -H; Fotsis, -T; Bannwart, -C; Wahala, -K; Makela, -T; Brunow, -G; Hase, -T: Determination of urinary lignan and phytoestrogen metabolites, potential antiestrogens and anticarcinogens in urine of women on various habitual diets. *J-Steroid-Biochem.* 1986; 25: 791-797.
- 10 Akiyama, -T; Ishida, -J; Nakagawa, -S; Ogawara, -H; Watanabe, -S-I; Itoh, -N; Shibuya, -M; Fukami, -Y: Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein-kinase. *J-Biol-Chem.* 1987; 262: 5592-95.11  
Albertazi, -P; Purdie, -D-W: The nature and utility of the phytoestrogens: a review of the evidence. *Maturitas* 2002; 42: 173-185.
- 12 Anderson, -W-F; Reiner, -A-S; Matsuno, -R-K; Pfeiffer -R-M: Shifting breast cancer trends in the United States. *J-Clin-Oncol.* 2007 Sept 1; 25(25): 3923-9
- 13 Ardanaz, -E; Moreno-Iribas, -C; Perez-de-Rada, -M-E; Ezponda, -C; Floristan, -Y; Navaridas, -N; Martinez-Penuela, -J-M; Puras, -A; Santamaria, -M; Ezpeleta, -I; Valerdi, -J-J; Pardo, -F-J; Monzon, F-J; Lizarraga, -J; Ortigosa, -C; Resano, -J; Barricarte, -A: Incidence and mortality due to cancer in Navarre, 1998-2002. Trends in the last 30 years. *An-Sist-Sanit-Navar.* 2007 May-Aug; 30(2): 245-70.
- 14 Armstrong, -B: Recent trends in breast cancer incidence and mortality in relation to changes in possible risk factors. *Int-J-Cancer.* 1976 Feb 15; 17(2): 204-11.
- 15 Aune, -T-M; Pogue, -S-L: Inhibition of tumor cell growth by interferon-gamma is mediated by two distinct mechanisms dependent upon oxygen tension: induction of tryptophan degradation and depletion of intracellular nicotinamide adenine dinucleotide. *J-Clin-Invest.* 1989 Sep; 84(3): 863-75.
- 16 Axelsson, -M; Sjövall, -J; Gustafsson, -B-E; Setchell, -K-D-R: Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants. *Nature.* 1982; 298: 659-660.
- 17 Becker, -N; Altenburg, -H-P; Stegmaier, -C; Ziegler, -H: Report on trends of incidence (1970-2002) and mortality (1952-2002) from cancer in Germany. *J-Cancer-Res-Clin-Oncol.* 2007 Jan; 133(1): 23-35.

- 18 Bergman-Jungstrom, -M; Thompson, -L-U; Dabrosin, -C: Flaxseed and its lignans inhibit estradiol-induced growth, angiogenesis and secretion of vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts in vivo. *Clin-Cancer-Res.* 2007 Feb; 13(3): 1061-7.
- 19 Bernstein, -L; Henderson, -B-E; Hanisch, -R; Sullivan-Halley, -J; Ross, -R-K: Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women. *J-Natl-Cancer-Inst.* 1994 Sep 21; 86(18): 1403-1408.
- 20 Boccardo, -F; Puntoni, -M; Guglielmini, -P; Rubagotti, -A: Enterolactone as a risk factor for breast cancer: a review of a published evidence. *Clin-Chim-Acta.* 2006; 365: 58-67.
- 21 Bogensberger, -S; Boss, -N; Büttner, -M; Jäckle, -R; Jäckle-Kirchhoff, -S; Meier, -G; Nawrocki, -P; Parzhuber, -S; Pilsinger, -R; Rempe-Baldin, -W; Scheele, -B; Striebeck, -C; Wangerin, -G: *Roche Lexikon Medizin.* 4. Auflage. Urban & Fischer Verlag. 1998. pp: 94, 1569.
- 22 Borriello, -S-P; Setchell, -K-D; Axelson, -M; Lawson, -A-M: Production and metabolism of lignans by the human faecal flora. *J-Appl-Bacteriol.* 1985 Jan; 58(1): 37-43.
- 23 Boyle, -P; Leake, -R: Progress in understanding breast cancer. *Epidemiological and biological interactions.* *Breast-Cancer-Res-Treat.* 1988; 11:91-112.
- 24 Brenner, -H; Stegmaier, -C; Ziegler, -H: Projektion der Krebsneuerkrankungen bis zum Jahr 2002--ein Beitrag zur Bedarfsplanung im Gesundheitswesen aus dem Saarlandischen Krebsregister. *Gesundheitswesen.* 1993 Dec; 55(12): 648-52.
- 25 Brownson, -D-M; Azios, -N-G; Fuqua, -B-K; Dharmawardhane, -S-F; Mabry, -T-J: Flavonoid effects relevant to cancer. *J-Nutr.* 2002 Nov; 132(11 Suppl): 3482S-3489S.
- 26 Brunelli, -E; Minassi, -A; Appendino, -G; Moro, -L: 8-Phrenylnaringenin, inhibits estrogen receptor-alpha mediated cell growth and induces apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *J-Steroid-Biochem-Mol-Biol.* 2007 Nov-Dec; 107(3-5): 140-8.
- 27 Brzezinski, -A; Debi, -A: Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *Eur-J-Obstetr-Gynecol-Reprod-Biol.* 1999 Jul; 85(1): 47-51.
- 28 Budzikiewicz, -H; Grigsby, R-D: Mass spectrometry and isotopes: a century of research and discussion. *Mass-Spectrom-Rev.* 2006 Jan-Feb; 25; 25(1): 146-57.
- 29 Budzikiewicz, -H: *Massenspektrometrie.* Verlag Chemie GmbH, Weinheim. 1980; p 27.
- 30 Cabaravdic, -M: Xenoestrogen effects of chemical compounds: influence on the breast cancer. *Med-Arh.* 2006; 60(6 Suppl 2): 97-100.
- 31 Cappelletti, -V; Miodini, -P; Di-Fronzo, -G; Daidone, -M-G: Modulation of estrogen receptor-beta isoforms by phytoestrogens in breast cancer cells. *Int-J-Oncol.* 2006 May; 28(5): 1185-91.
- 32 Cassidy, -A: Potential risks and benefits of phytoestrogen-rich diets. *Int-J-Vitam-Nutr-Res.* 2003 Mar; 73(2): 120-6.
- 33 Carroll, -K-K: Lipids and carcinogenesis. *J-Environ-Pathol-Toxicol.* 1980 Mar; 3(4 Spec No): 253-71.
- 34 Chambraud, -B; Berry, -M; Redeuilh, -G; Chambon, -P; Baulieu, -E-E: Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. *J-Biol-Chem.* 1990 Nov 25; 265(33): 20686-91.
- 35 Chamras, -H; Barsky, -S-H; Ardashian, -A; Navasartian, -D; Heber, -D; Glaspy, -J-A: Novel interactions of Vitamin E and estrogen in breast cancer. *Nutr-Cancer.* 2005 May 1; 52: 43-48.
- 36 Chen, -J-Q; Yager, -J; Russo, -J: Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential

- physiological/pathophysiological implications. *Biochem-Biophys-Acta*. 2005; 1746: 1-17.
- 37 Chen, -J; Thompson, -L-U: Lignans and tamoxifen, alone or in combination, reduce human breast cancer cell adhesion, invasion and migration in vitro. *Breast-Cancer-Res-Treat*. 2003 Jul; 80(2): 163-70.
  - 38 Chen, -J; Stavro, -P-M; Thompson, -L-U: Dietary flaxseed inhibits human breast cancer growth and metastasis and downregulates expression of insulin-like growth factor and epidermal growth factor receptor. *Nutr-Cancer*. 2002; 43(2): 187-92.
  - 39 Conway, -K; Parrish, -E; Edmiston, -S-N; Tolbert, -D; Tse, -C-K; Geradts, -J; Livasy, -C-A; Singh, -H; Newman, -B; Millikan, -R-C: The estrogen receptor- $\alpha$  A908G (K303R) mutation occurs at a low frequency in invasive breast tumors: results from a population-based study. *Breast-Cancer-Res*. 2005; 7(6): R871-80.
  - 40 Coradini, -D; Biffi, -A; Cappelletti, -V; Di-Fronzo, -G: Activity of tamoxifen and new antiestrogens on estrogen receptor positive and negative breast cancer cells. *Anticancer-Res*. 1994 May-Jun; 14(3A): 1059-64.
  - 41 Cos, -P; De-Bruyne, -T; Apers, -S; Vanden-Berghe, -D; Pieters, -L; Vlietinck, -A-J: Phytoestrogens: recent developments. *Planta-Med*. 2003 Jul; 69(7): 589-99.
  - 42 Cosentino, -M; Marino, -F; Ferrari, -M; Rasini, -E; Bombelli, -R; Luini, -A; Legnaro, -M; Canne, -M-G; Luzzani, -M; Crema, -F; Paracchini, -S; Lecchini, -S: Estrogenic activity of 7-hydroxymatairesinol potassium acetate (HMR/lignantrade mark) from Norway spruce (*Picea abies*) knots and of its active metabolite enterolactone in MCF-7 cells. *Pharmacol-Res*. 2007 Aug; 56(2): 140-7.
  - 43 Dai, -Q; Franke, -A-A; Yu, -H; Shu, -X-O; Jin, -F; Hebert, -J-R; Custer, -L-J; Gao, -Y-T; Zheng, -W: Urinary phytoestrogen excretion and breast cancer risk: evaluating potential effect modifiers endogenous estrogens and anthropometrics. *Cancer-Epidemiol-Biomarkers-Prev*. 2003 Jun; 12(6): 497-502.
  - 44 Davis, -D-L; Dinse, -G-E; Hoel, -D-E: Decreasing cardiovascular disease and increasing cancer among whites in the United States from 1973 through 1987. Good news and bad news. *JAMA*. 1994 Feb 9; 271(6): 431-7.
  - 45 Denizot, -F; Lang, -R: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J-Immunol-Methods*. 1986; 89(2): 271-7.
  - 46 Deroo, -B-J; Korach, -K-S: Estrogen receptors and human disease. *J-Clin-Invest*. 2006; 116: 561-570.
  - 47 Devesa, -S-S; Blot, -W-J; Stone, -B-J; Miller, -B-A; Tarone, -R-E; Fraumeni, -J-F Jr: Recent cancer trends in the United States. *J-Natl-Cancer-Inst*. 1995 Feb 1; 87(3): 175-82.
  - 48 Dorssers, -L-C-J; Foekens, -J-A; Veldscholte, -J-W-M: Project: Characterization of breast cancer anti-estrogen resistance pathways by gene expression profiling. *Dutch-Cancer-Society*. 2006.
  - 49 Evans, -R-M: The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 1988 May 13; 240(4854): 889-95.
  - 50 Ewan, -K-B-R; Oketch-Rabah, -H-A; Ravani, -S-A; Shyamala, -G; Moses, -H-L; Barcellos-Hoff, -M-H: Proliferation of estrogen receptor- $\alpha$ -positive mammary epithelial cells is restrained by transforming growth factor- $\beta$ 1 in adult mice. *Am-J-Pathol*. 2005; 167: 409-417.
  - 51 Ferlay, -J; Autier, -P; Boniol, -M; Heanue, -M; Colombet, -M; Boyle, -P: Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann-Oncol*. 2007 Mar; 18(3): 581-92.

- 52 Ferriola, -P-C; Cody, -V; Middleton, -E Jr: Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem-Pharmacol.* 1989; 38: 1617-24.
- 53 Filleur, -F; Le-Bail, -J-C; Duroux, -J-L; Simon, -A; Chulia, -A-J: Antiproliferative, anti-aromatase, anti-17beta-HSD and antioxidant activities of lignans isolated from *Myrica argentea*. *Planta-Med.* 2001 Nov; 67(8): 700-4.
- 54 Fokialakis, -N; Magiatis, -P; Mitaku, -S; Pratsinis, -H; Tillequin, -F: Estrogenic activity of phenylpropanoids from *Sarcomelicope megistophylla* and structure determination of a new norneolignan. *Planta-Med.* 2003 Jun; 69(6): 566-8.
- 55 Fotsis, -T; Pepper, -M; Adlercreutz, -H; Fleischmann, -G; Hase, -T; Montesano, -R; Schweigerer, -L: Genistein, a dietary-derived inhibitor of *in-vitro* angiogenesis. *Proc-Natl-Acad-Sci-USA.* 1993; 90: 2690-2694.
- 56 Furlenmeier, -M; Schwitter, -N: Kraft der Heilpflanzen. Verlag F. P. Schwitter Holding Zürich. 1981; 3. Auflage; p: 108.
- 57 Gallo, -D; Ferlini, -C; Fabrizi, -M; Prislei, -S; Scambia, -G: Lack of stimulatory activity of a phytoestrogen-containing soy extract on the growth of breast cancer tumors in mice. *Carcinogenesis.* 2006 Jul; (27)7: 1404-9.
- 58 Geahlen, -R-L; Koonvhanok, -N-M; McLaughlin, -L-I; Pratt, -D-E: Inhibition of protein tyrosine kinase activity by flavonoids and related compounds. *J-Natl-Prod.* 1989; 52: 982-86.
- 59 Gehm, -B-D; McAndrews, -J-M; Chien, -P-Y; Jameson, J-L: Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* 1997 Dec 9; 94(25): 14138-43.
- 60 Gikas, -P-D; Mokbel, -K: Phytoestrogens and the risk of breast cancer: a review of the literature. *Int-J-Fertil-Womens-Med.* 2005 Nov-Dec; 50(6): 250-8.
- 61 Grace, -P-B; Taylor, -J-I; Low, -Y-L; Luben, -R-N; Mulligan, -A-A; Botting, -N-P; Dowsett, -M; Welch, -A-A; Khaw, -K-T; Wareham, -N-J; Day, -N-E; Bingham, -S-A: Phytoestrogen concentrations in serum and spot urine as biomarkers for dietary phytoestrogen intake and their relation to breast cancer risk in European prospective investigation of cancer and nutrition Norfolk. *Cancer-Epidemiol-Biomarkers-Prev.* 2004 May; 13(5): 698-708.
- 62 Grandien, -K; Bachdahl, -M; Ljunggren, -O; Gustafsson, -J-A; Berkenstam, -A: Estrogen target tissue determines alternative promoter utilization of the human estrogen receptor gene in osteoblasts and tumor cell lines. *Endocrinology.* 1995 May; 136(5): 2223-9.
- 63 Green, -S; Walter, -P; Greene, -G; Krust, -A; Goffin, -C; Jensen, -E; Scrase, -G; Waterfield, -M; Chambon, -P: Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J-Steroid-Biochem.* 1986 Jan; 24(1): 77-83.
- 64 Green, -S; Kumar, -V; Krust, -A; Walter, -P; Chambon, -P: Structural and functional domains of the estrogen receptor. *Cold-Spring-Harb-Symp-Quant-Biol.* 1986; 51 Pt 2: 751-8.
- 65 Greene, -G-L; Gilna, -P; Waterfield, -M; Baker, -A; Hort, -Y; Shine, -J: Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science.* 1986; 231: 1150-1154.
- 66 Hakama, -M; Soini, -I; Kuosma, -E; Lehtonen, -M; Aromaa, -A: Breast cancer incidence: geographical correlations in Finland. *Int-J-Epidemiol.* 1979 Mar; 8(1): 33-40.
- 67 Hall, -J-M; McDonnell, -D-P: The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology.* 1999 Dec; 140(12): 5566-78.

- 68 Hawker, -J-R Jr: Chemiluminescence-based BrdU ELISA to measure DNA-synthesis. *J-Immunol-Methods*. 2003; 274(1-2): 77-82.
- 69 Hewitt, -S-C; Deroo, -B-J; Hansen, -K; Collins -J; Grissom, -S; Afshari, -C-A; Korach, -K,-S: Estrogen receptor-dependent genomic responses in the uterus mirror the biphasic physiological response to estrogen. *Mol-Endocrinol*. 2003 Oct; 17(10): 2070-83.
- 70 Hofvind, -S; Sorum, -R; Haldorsen, -T; Langmark, -F: Incidence of breast cancer before and after implementation of mammography screening. *Tidsskr-Nor-Laegeforen*. 2006 Nov 16; 126(22): 2935-8.
- 71 Hofvind, -S-S; Thoresen, -S-O: Physical activity and breast cancer. *Tidsskr-Nor-Laegeforen*. 2001 Jun 20; 121(16): 1892-5.
- 72 Horn, -F; Moc, -I; Schneider, -N; Grillhösl, -C; Berghold, -S; Lindenmeier, -G: *Biochemie des Menschen*. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York. 2005. 3.Auflage: 347-8.
- 73 Horner, -N-K; Kristal, -A-R; Prunty, -J; Skor, -H-E; Potter, -J-D; Lampe, -J-W: Dietary determinants of plasma enterolactone. *Cancer-Epidemiol-Biomarkers-Prev*. 2002 Jan; 11(1): 121-6.
- 74 Horn-Ross, -P-L; Hoggatt, -K-J; West, -D-W; Krone, -M-R; Stewart, -M-L; Anton, -H; Bernstein, -C-L; Deapen, -D; Peel, -D; Pinder, -R; Reynolds, -P; Ross, -R-K; Wright, -W; Ziogas, -A: Recent diet and breast cancer risk: the California Teacher study (USA). *Cancer-Causes-Control*. 2002 Jun; 13(5): 407-15.
- 75 Hossain, -A; Kuo, -M-T; Saunders, -G-F: *Mir-17-5p* regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of *AIB1* mRNA. *Mol-Cell-Biol*. 2006 Nov; 26(21): 8191-8201.
- 76 Hsu, -S-M; Raine, -L; Fanger, -H: A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am-J-Clin-Pathol*. 1981 May; 75(5): 734-738.
- 77 Hulten, -K; Winkvist, A; Lenner, -P; Johansson, -R; Adlercreutz, -H; Hallmans, -G: An incident case-referent study on plasma enterolactone and breast cancer risk. *Eur-J-Nutr*. 2002; 41: 168-76.
- 78 Jackson, -T-A; Richer, -J-K; Bain, -D-L; Takimoto, G-S; Tung, -L; Horwitz, -K-B: The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the co-repressors N-CoR or SMRT. *Mol-Endocrinol*. 1997 Jun; 11(6): 693-705.
- 79 Jain, -R-V; Mills, -P-K; Parikh-Patel, -A: Cancer incidence in the south Asian population of California, 1988-2000. *J-Carcinog*. 2005 Nov 10; 4: 21.
- 80 Jemal, -A; Ward, -E; Thun, -M-J: Recent trends in breast cancer incidence rates by age and tumor characteristics among U.S. women. *Breast-Cancer-Res*. 2007; 9(3): R28.
- 81 Jensen, -E-V; Jacobsen, -H-I: Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent-Progress-in-Hormone-Research*. 1962; 18: 387-414.
- 82 Johnston, -P-V: Flaxseed oil and cancer:  $\alpha$ -linolenic acid and carcinogenesis. In: *Flaxseed in Human Nutrition* (Cunnane, S. & Thompson, L.U., eds.), 1995; pp. 207-218. AOCS Press, Champaign, IL.
- 83 Kato, -S; Endoh, -H; Masuhiro, -Y; Kitamoto, -T; Uchiyama, -S; Sasaki, -H; Masushige, -S; Gotoh, -Y; Nishida, -E; Kawashima, -H; Metzger, -D; Chambon, -P: Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*. 1995; 270: 1491-1494.
- 84 Keinan-Boker, -L; van Der Shouw, -Y-T; Grobbee, -D-E; Peeters, -P-H: Dietary phytoestrogens and breast cancer risk. *Am-J-Clin-Nutr*. 2004 Feb; 79(2): 282-8.



- 85 Kelly, -M-J; Levin, -E-R: Rapid action of plasma membrane estrogen receptors. *Trends-Endocrinol-Metab.* 2001; 12: 152-156.
- 86 Key, -T-J; Sharp, -G-B; Appelby, -P-N; Beral, -V; Goodman, -M-T; Soda, -M; Mabuchi, -K: Soya foods and breast cancer risk: a prospective study in Hiroshima and Nagasaki, Japan. *Br-J-Cancer.* 1999; 81: 1248-1256.
- 87 Kilkkinen, -A; Stumpf, -K; Pietinen, -P; Valsta, -L-M; Tapanainen, -H; Adlercreutz, -H: Determinants of serum enterolactone concentration. *Am-J-Clin-Nutr.* 2001 Jun; 73(6): 1094-100.
- 88 Kinder, -D: MCF-7 breast cancer cell line grown in agarose culture for study of COX-2 inhibitors in three-dimensional growth system. *Cancers-Lett.* 2005; 205: 49-53.
- 89 Klein-Hitpass, -L; Ryffel, -G-U; Heitlinger, -E; Cato, -A-C: A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic-Acids-Res.* 1988 Jan 25; 16(2): 647-63.
- 90 Koehler, -K-F; Helguero, -L-A; Maldosen, -L-A; Warner, -M; Gustafsson, -J-A: Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr-Rev.* 2005; 26: 465-478.
- 91 Krentz, -H: Statistische Analysen mit SPSS in der Medizin Band 2: Schließende Statistische Analysen. Shaker Verlag Aachen. 2005; pp: 17-18, 47, 96, 101.
- 92 Kuiper, -G-G; Lemmen, J-G; Carlsson, -B; Corton, -J-C; Safe, -S-H; van-der-Saag, -P-T; van-der-Burg, -B; Gustafsson, -J-A: Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 1998, 139(10): 4252-63.
- 93 Kuiper, -G-G; Carlsson, -B; Grandien, -K; Enmark, -E; Häggblad, -J; Nilsson, -S; Gustafsson, -J-A: Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptor alpha and beta. *Endocrinology*. 1997; 138(3): 863-70.
- 94 Kuiper, -G-G; Enmark, -E; Peltö-Huikko, -M; Nilsson, -S; Gustafsson, -J-A: Cloning a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* 1996 Jun 11; 93(12): 5925-30.
- 95 Kulling, -S-E; Watzl, -B: Phytoöstrogene. *Ernährungs-Umschau.* 2003; 50(6): 234-39.
- 96 Kurzer, -M-S; Xu, -X: Dietary phytoestrogens. *Annu-Rev-Nutr.* 1997; 17: 353-81.
- 97 Lee, -H-P; Gourley, -L; Duffy, -S-W; Estève, -J; Lee, -J; Day, -N-E: Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet.* 1991 May 18; 337(8751): 1197-200.
- 98 Levin, -E-R: Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids.* 2002; 67: 471-75.
- 99 Leygue, -E; Dotzlaw, -H; Lu, -B; Glor, -C; Watson, -P-H; Murphy, -L-C: Estrogen receptor beta: mine is longer than yours? *J-Clin-Endocrinol-Metab.* 1998 Oct; 83(10): 3754-5.
- 100 Li, -G; Lee, -C-S; Woo, -M-H; Lee, -S-H; Chang, -H-W; Son, -J-K: Lignans from the bark of *Machilus thunbergii* and their DNA topoisomerases I and II inhibition and cytotoxicity. *Biol-Pharm-Bull.* 2004 Jul; 27(7): 1147-50.
- 101 Limer, -J-L; Speirs, -V: Phyto-estrogens and breast cancer chemoprevention. *Breast-Cancer-Res.* 2004; 6: 119-27.
- 102 Linseisen, -J; Piller, -R; Hermann, -S; Chang-Claude, -J: Dietary phytoestrogen intake and premenopausal breast cancer risk in a German case-control study. *Int-J-Cancer.* 2004 Jun 10; 110(2):284-90.
- 103 Longnecker, -M-P: Alcoholic beverage consumption in relation to risk of breast cancer: meta-analysis and review. *Cancer-Causes-Control.* 1994 Jan; 5(1): 73-82.
- 104 Lu, -L-J; Lin, -S-N; Grady, -J-J; Nagamani, -M; Anderson, -K-E: Altered kinetics and extent of urinary daidzein and genistein excretion in women during chronic soya exposure. *Nutr-Cancer.* 1996; 26(3): 289-302.

- 105 Lutz, -J-M; Francisci, -S; Mugno, -E; Usel, -M; Pompe-Kirn, -V; Coebergh, -J-W; Bieslka-Lasota, M: Cancer prevalence in Central Europe: the EUROPREVAL Study. *Ann-Oncol.* 2003 Febr; 14(2): 313-22.
- 106 Luyengi, -L; Suh, -N; Fong, -H-H; Pezzuto, -J-M; Kinghorn, -A-D: A lignan and four terpenoids from *Brucea javanica* that induce differentiation with cultured HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Phytochemistry.* 1996 Sep; 43(2): 409-12.
- 107 Lynge, -E; Rostgaard, -K; Kroman, -N; Lidegaard, -O; Kvistgaard, -M-E: Descriptive epidemiology: development of incidence over time, geographical and social differences, risk factors, etc. *Ugeskr-Laeger.* 2007 Sep 3; 169(36):2965-7.
- 108 Magee, -P-J; McGlynn, -H; Rowland, -I-R: Differential effects of isoflavones and lignans on invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro. *Cancer-Lett.* 2004 May 10; 208(1): 35-41.
- 109 Mangelsdorf, -D-J; Thummel, -C; Beato, -M; Herrlich, -P; Schutz, -G; Umesono, -K; Blumberg, -B; Kastner, -P; Mark, -M; Chambon, -P; Evans, -R-M: The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 1995 Dec 15; 83(6): 835-9.
- 110 Markovits, -J; Linassier, -C; Fosse, -P; Couprie, -J; Pierre, -J; Jacquemin-Sablon, -A; Saucier, -J-M; Le-Pecq, -J-B; Larsen, -A-K: Inhibitory effects of tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer-Res.* 1989; 49:5111-5117.
- 111 Maskarinec, -G; Oshiro, -C; Morimoto, -Y; Hebshi, -S; Novotny, -R; Franke, -A-A: Urinary isoflavone excretion as a compliance measure in a soy intervention among young girls: a pilot study. *Eur-J-Clin-Nutr.* 2005; 59: 369-375.
- 112 Matthews, -J; Gustafsson, -J-A: Estrogen signaling: a subtle balance between ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *Mol Interv.* 2003; 3: 281-292.
- 113 McDonnell, -D-P; Connor, -C-E; Wijayaratne, -A; Chang, -C-Y; Norris, -J-D: Definition of the molecular and cellular mechanisms underlying the tissue-selective agonist/ antagonist activities of selective estrogen receptor modulators. *Recent-Prog-Horm-Res.* 2002; 57:295-316.
- 114 McMichael-Phillips, -D-F; Harding, -C; Morton, -M; Roberts, -S-A; Howell, -A; Potten, -C-S; Bundred, -N-J: Effects of soy-protein supplementation on epithelial proliferation in the histologically normal human breast. *Am-J-Clin-Nutr.* 1998 Dec; 68(6 Suppl): 1431S-1435S.
- 115 Messina, -M-J; Loprinzi, -C-L: Soy for breast cancer survivors: a critical review of the literature. *J-Nutr.* 2001; 131: 3095S-3108S.
- 116 Messina, -M-J; Persky, -V; Setchell, -K-D; Barnes, -S: Soy intake and cancer risk: a review of *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr-Cancer.* 1994; 21:113-131.
- 117 Mishra, S-I; Dickerson, -V; Najm, -W: Phytoestrogens and breast cancer prevention: what is evidence? *Ann-J-Obstet-Gynecol.* 2003 May; 188(5 Suppl): S66-70.
- 118 Montano, -M-M; Muller, -V; Trobaugh, -A; Katzenellenbogen, -B-S: The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol-Endocrinol.* 1995. 9(7): 814-25.
- 119 Morito, -K; Hirose, -T; Kinjo, -J; Hirakawa, -T; Okawa, -M; Nohara, -T; Ogawa, -S; Inoue, -S; Muramatsu, -M; Masamune, -Y: Interaction of Phytoestrogens with ER  $\alpha$  and  $\beta$ . *Biol-Pharm-Bull.* 2001 Apr; 24(4): 351-6.
- 120 Mosmann, -T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J-Immunol-Methods.* 1983 Dec 16; 65(1-2): 55-63.
- 121 Mosselman, -S; Polman, -J; Dijkema, -R: ER $\beta$ : Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS-Lett.* 1996; 392: 49-53.

- 122 Moutsatsou, -P: The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. *Hormones-(Athens)*. 2007 Jul-Sep; 6(3): 173-93.
- 123 Neeman, -M; Degani, -H: Early estrogen-induced metabolic changes and their inhibition by actinomycin D and cycloheximide in human breast cancer cells: 31P and 13C NMR studies. *Proc-Natl-Acad-Sci*. 1989 Jul; 86(14): 5585-5589.
- 124 Newbold, -R-R; Banks, -E-P; Bullock, -B; Jefferson, -W-N: Uterine Adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. *Cancer-Res*. 2001 Jun; 61(11): 4325-8.
- 125 Norris, -J-D; Fan, -D; Kerner, S-A; McDonnell, -D-P: Identification of a third autonomous activation domain within the human estrogen receptor. *Mol-Endocrinol*. 1997 Jun; 11(6): 747-54.
- 126 Nuntanakorn, -P; Jiang, -B; Einbond, -L-S; Yang, -H; Kronenberg, -F; Weinstein, -I-B; Kenelly, -E-J: Polyphenolic constituents of *Actaea racemosa*. *J-Nat-Prod*. 2006 Mar; 69(3): 314-8.
- 127 Oberdisse, -E; Hackenthal, -E; Kuschinsky, -K: *Pharmakologie und Toxikologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 2002. 3.Auflage: p. 44.
- 128 Okura, -A; Arakawa, -H; Oka, -H; Yoshinari, -T; Monden, -Y: Effects of genistein on topoisomerase activity on the growth of [Val 12] Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells. *Biochem-Biophys-Res-Commun*. 1988; 157: 183-9.
- 129 Paruthiyil, -S; Parmar, -H; Kerekatte, -V; Cunha, -G-R; Firestone, -G-L; Leitman, -D-C: Estrogen receptor  $\beta$  inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G<sub>2</sub> cell cycle arrest. *Cancer-Research*. 2004, Jan 1; 64: 423-428.
- 130 Peeters, -P-H; Slimani, -N; van-der-Schouw, -Y-T; Grace, -P-B; Navarro, -C; Tjonneland, -A; Olsen, -A; Clavel-Chapelon, -F; Touillaud, -M; Boutron-Ruault, -M-C; Jenab, -M; Kaaks, -R; Linseisen, -J; Trichopoulou, -D; Dilis, -V; Boeing, -H; Weikert, -C; Overvad, -K; Pala, -V; Palli, -D; Panico, -S; Tumino, -R; Vineis, -P; Bueno-de-Mesquita, -H-B; van-Gils, -C-H; Skeie, -G; Jakszyn, -P; Hallmans, -G; Berglund, -G; Key, -T-J; Travis, -R; Riboli, -E; Bingham, -S-A: Variations in plasma phytoestrogen concentrations in European adults. *J-Nutr*. 2007 May; 137(5): 1294-300.
- 131 Piller, -R; Chang-Claude, -J; Linseisen, -J: Plasma enterolactone and genistein and the risk of premenopausal breast cancer. *Eur-J-Cancer-Prev*. 2006 Jun; 15(3): 225-32.
- 132 Power, -K-A; Saarinen, -N-M; Chen, -J-M; Thompson, -L-U: Mammalian Lignans enterolactone and enterodiol, alone and in combination with the isoflavone genistein, do not promote the growth of MCF-7 xenografts in ovariectomized athymic nude mice. *Int-J-Cancer*. 2006 Mar; 118(5): 1316-20.
- 133 Ramanathan, -L; Gray, -W-G: Identification and characterization of a phytoestrogenspecific gene from the MCF-7 human breast cancer cell. *Toxicol-Appl-Pharmacol*. 2003 Sep 1; 191(2): 107-17.
- 134 Reddel, -R-R; Sutherland, -R-L: Effects of pharmacological concentrations of estrogens on proliferation and cell cycle kinetics of human breast cancer cell lines *in-vitro*. *Cancer-Res*. 1987 Oct 15; 47: 5323-5329.
- 135 Rickard, -S-E; Orcheson, -L-J; Seidl, -M-M; Luyengi, -L; Fong, -H-H; Thompson, -L-U: Dose-dependent production of mammalian lignans in rats and in vitro from the purified precursor secoisolariciresinol diglycoside in flaxseed. *J-Nutr*. 1996 Aug; 126(8): 2012-9.
- 136 Robbins, -A-S; Clarke, -C-A: Regional changes in hormone therapy use and breast cancer incidence in California from 2001 to 2004. *J-Clin-Oncol*. 2007 Aug 10; 25(23): 3437-9.

- 137 Saarinen, -N-M; Power, -K; Chen, -J; Thompson, -L-U: Flaxseed attenuates the tumor growth stimulating effect of soy protein in ovariectomized athymis mice with MCF-7 human breast cancer xenografts. *Int-J-Cancer*. 2006 Aug; 119(4): 925-31.
- 138 Saito, -H; Masuda, -T; Tashita, -A; Ishiwata, Y; Yokochi, -S; Mitani, T; Ishii, -H: Liver, pancreas and biliary tract: Effect of ethanol on mouse hepatitis virus-induced cytotoxicity. *J-Gastroenterol*. 1995 Dec 25; 31(5): 679-83.
- 139 Sathyamoorthy, -N; Wang, -T-T-Y; Phang, -J-M: Stimulation of pS2 expression by diet-derived compounds. *Cancer-Res*. 1994; 79: 957-61.
- 140 Schapira, -D-V; Clark, -R-A; Wolff, -P-A; Jarrett, -A-R; Kumar, -N-B; Azis -N-M: Visceral obesity and breast cancer risk. *Cancer*. 1994 Jul 15; 74(2): 632-9.
- 141 Scheller, -K; Sekeris, -C-E; Krohne, -G; Hock, -R; Hansen, -I-A; Scheer, -U: Localization of glucocorticoid hormone receptors in mitochondria of human cells. *Eur-J-Cell-Biol*. 2000; 79: 299-307.
- 142 Sellers, -J-R; Cook, -S; Goldmacher, -V-S: A cytotoxicity assay utilizing a fluorescent dye that determines accurate surviving fractions of cells. *J-Immunol-Methods*. 1994; 172(2): 255-64.
- 143 Seo, -H-S; DeNardo, -D-G; Jacqout, -Y; Laios, -I; Vidal, -D-S; Zambrana, -C-R; Leclercq, -G; Brown, -P-H: Stimulatory effect of genistein and apigenin on the growth of breast cancer cells correlates with their ability to activate ER alpha. *Breast-Cancer-Res-Treat*. 2006 Sep; 99(2): 121-34.
- 144 Setchell, -K-D-R; Lawson, -A-M; Borriello, -S-P; Harkness, -R; Gordon, -H; Morgan, -D-M-L; Kirk, -D-N; Adlercreutz, -H; Anderson, -L-C; Axelson, -M: Lignan formation in man: microbial involvement and possible roles in relation to cancer. *Lancet*. 1981a; ii 4-7.
- 145 Shimizu, -H; Ross, -R-K; Bernstein, -L; Yatani, -R; Henderson, -B-E; Mack, -T-M: Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br-J-Cancer*. 1991 Jun; 63(6): 963-6.
- 146 Shu, -X-O; Jin, -F; Dai, -Q; Wen, -W; Potter, -J-D; Kushi, -L-H; Ruan, -Z; Gao, -Y-T; Zheng, -W: Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women. *Cancer-Epidemiol-Biomarkers-Prev*. 2001; 10: 483-88.
- 147 Sicilia, -T; Niemeyer, -H-B; Honig, -D-M; Metzler, -M: Identification and stereochemical characterization of lignans in flaxseed and pumpkin seeds. *J-Agric-Food-Chem*. 2003 Feb 26; 51(5): 1181-8.
- 148 Simoncini, -T; Hafezi-Moghadam, -A; Brazil, -D-P; Ley, -K; Chin, -W; Liao, -J-K: Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH-kinase. *Nature*. 2000; 407: 538-541.
- 149 Smigal, -C; Jemal, -A; Ward, -E; Cokkinides, -V; Smith, -R; Howe, -H-L; Thun, -M: Trends in Breast Cancer by race and ethnicity: update 2006. *CA-Cancer-J-Clin*. 2006 May-Jun; 56(3): 168-83.
- 150 Solakidi, -S; Psarra, -A-M; Sekeris, -C: Differential subcellular distribution of estrogen receptor isoforms: Localization of ER $\alpha$  in the nucleoli and ER $\beta$  in the mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines. *Biochem-Biophys-Acta*. 2005; 1745: 382-392.
- 151 Sonnenschein, -C; Soto, -A-M: An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J-Steroid-Biochem-Mol-Biol*. 1998 Apr; 65(1-6): 143-50.
- 152 Stoll, -B-A: Eating to beat breast cancer: potential role for soy supplements. *Ann-Oncol*. 1997 Mar; 8(3): 223-5.
- 153 Strauss, -L; Santii, -R; Saarinen, -N; Streng, -T; Joshi, -S; Mäkelä, -S: Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependent disease. *Toxicol-Lett*. 1998; 102-103: 349-54.

- 154 Thompson, -L-U; Seidl, -M-M; Rickard, -S-E; Orcheson, -L-J; Fong, -H-H: Antitumorigenic effect of a mammalian lignan precursor from flaxseed. *Nutr-Cancer*. 1996; 26: 159-165.
- 155 Tonetti, -D-A; Zhang, -Y; Zhao, -H; Lim, -S-B; Constantinou, -A-I: The effect of the phytoestrogens genistein, daidzein, and equol on the growth of tamoxifen-resistant T47D/ PKC alpha. *Nutr-Cancer*. 2007; 58(2): 222-9.
- 156 Tou, -J-C-L; Thompson, -L-U: Exposure to flaxseed or its lignan component during different developmental stages influences rat mammary gland structures. *Carcinogenesis*. 1999; 20: 1831-35.
- 157 Ullmannova, -V; Popescu, -N-C: Inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis, reactivation of DLC1, and modulation of other gene expression by dietary flavone in breast cancer cell lines. *Cancer-Detect-Prev*. 2007; 31(2): 110-8.
- 158 Verheus, -M; van Gils, -C-H; Keinan-Boker, -L; Grace, -P-B; Bingham, -S-A; Peeters, -P-H: Plasma phytoestrogens and subsequent breast cancer risk. *J-Clin-Oncol*. 2007; 25: 648-655.
- 159 Vihko, -V-J; Apter, -D-L; Pukkala, -E-I; Oinonen, -M-T; Hakulinen, -T-R; Vihko, -R-K: Risk of breast cancer among female teachers of physical education and languages. *Acta-Oncol*. 1992; 31(2): 201-4.
- 160 Wang, -L-Q: Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone. Review. *J-Chromatograph B* 2002; 777: 289-309.
- 161 Wang, -C; Kurzer, -M-S: Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. *Nutr-Cancer*. 1997; 28(3): 236-47.
- 162 Wang, -C; Makela, -T; Hase, -T; Adlercreutz, -H; Kurzer, -M-S: Lignans and flavonoids inhibit aromatase enzyme in human preadipocytes. *J-Steroid-Biochem-Mol-Biol*. 1994; 50: 205-12.
- 163 Welshons, -W-V; Murphy, -C-S; Koch, -R; Calaf, -G; Jordan, -V-C: Stimulation of breast cancer cells in vitro by the environmental estrogen enterolactone and the phytoestrogen equol. *Breast-Cancer-Res-Treat*. 1987; 10: 169-175.
- 164 White, -R; Lees, -J-A; Needham, -M; Ham, -J; Parker, -M: Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor. *Mol-Endocrinol*. 1987 Oct; 1(10): 735-44.
- 165 Wingo, -P-A; Ries, -L-A; Rosenberg, -H-M; Miller, -D-S; Edwards, -B-K: Cancer incidence and mortality, 1973-1995: a report card for the U.S. *Cancer*. 1998 Mar 15; 82(6): 1197-207.
- 166 Woodward, -T-L; Lu, -H; Haslam, -S-Z: Laminin inhibits estrogen action in human breast cancer cells. *Endocrinol*. 2000; 141(8): 2814-2821.
- 167 Wu, -A-H; Pike, -M-C; Stram, -D-O: Meta-analysis: dietary fat intake, serum estrogen levels and the risk of breast cancer. *J-Natl-Cancer-Inst*. 1999 Mar 17; 91(6): 529-34.
- 168 Wu, -A-H; Ziegler, -R-G; Horn-Ross, -P-L; Nomura, -A-M; West, D-W; Kolonel, -L-N; Rosenthal, -J-F; Hoover, -R-N; Pike, -M-C: Tofu and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Cancer-Epidemiol-Biomarkers-Prev*. 1996 Nov; 5(11): 901-906.
- 169 Wynder, -E-L: Dietary factors related to breast cancer. *Cancer*. 1980 Aug 15; 46(4 Suppl): 899-904.
- 170 Xu, -S; Li, -N; Ning, -M-M; Zhou, -C-H; Yang, -Q-R; Wang, -M-W: Bioactive compounds from *Peperomia pellucida*. *J-Nat-Prod*. 2006 Feb; 69(2): 247-50.
- 171 Xu, -X; Wang, -H-J; Murphy, -P-A; Cook, -L; Hendrich, -S: Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women. *J-Nutr*. 1994; 124: 825-832.
- 172 Xu, -X; Harris, K-S; Wang, -H-J; Murphy, -P-A; Hendrich, -S: Bioavailability of soybean isoflavones depends on gut microflora in women. *J-Nutr*. 1995; 125:2307-15.
- 173 Ylikomi, -T; Wurtz, -J-M; Syvala, -H; Passinen, -S; Pekki, -A; Haverinen, -M; Blauer, -M; Tuohimaa, -P; Gronemeyer, -H: Reappraisal of the role of heat shock proteins as

- regulators of steroid receptor activity. *Crit-Rev-Biochem-Mol-Biol.* 1998; 33(6): 437-66.
- 174 Yokota, -T; Matsuzaki, -Y; Koyama, -M; Hitomi, -T; Kawanaka, -M; Enoki-Konishi, -M; Okuyama, -Y; Takayasu, -J; Nishino, -H; Nishikawa, -A; Osawa, -T; Sakai, -T: Sesamin, a lignan of sesame, down-regulates cyclin D1 protein expression in human tumor cells. *Cancer-Sci.* 2007 Sep; 98(9): 1447-53.
- 175 Yu, -Z; Zhang, -L; Wu, -D: Genistein induced apoptosis in MCF-7 and T47D cells. *Wei-Sheng-Yan-Jiu.* 2003 Mar; 32(2): 125-7.
- 176 Zava, -D-T; Blen, -M; Duwe, -G: Estrogenic activity of natural and synthetic estrogens in human breast cancer cells in culture. *Environ-Health-Perspect.* 1997 Apr; 105 Suppl 3: 637-45.
- 177 Zava, -D-T; Duwe, -G: Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro. *Nutr-Cancer.* 1997; 27(1): 31-40.

### **Tagungen**

- 178 Matysik, -G; Beck, -E-M; Moebus, -S; Jöckel, -K-H: Prävalenz von Krebserkrankungen in der Heinz Nixdorf Recall Studie. 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie (gmds), 12. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Epidemiologie. Freiburg im Breisgau. 2005. German Medical Science 2005.

### **Dissertationen**

- 179 Waldschläger, -J: Extraktion von Phytoöstrogenen aus Leinsamen und Holunderblüten zur in-vitro-Testung an Hormonrezeptor-positiven Tumorzellen. Inauguraldissertation. 2006; pp 33-35, 63, 65, 70.

### **Kooperationen mit Fachbereichen der Universität Rostock und externen Einrichtungen**

- 180 Fachbereich Biowissenschaften der Universität Rostock (PD Dr. rer. nat. S. Abarzua)
- 181 Institut für Chemie der Universität Rostock (Dr. rer. nat. W. Ruth)
- 182 Steinbeis-Transferzentrum Soil Biotechnology (Dr. rer. nat. A. Schlichting)

### **Internet (Stand Mai 2008):**

- 183 Website der "American Type Culture Collection", Manassas, USA.
- 184 Website der "LGC Promochem" Cell Biology Catalog, 2006
- 185 <http://encyclopedia.thefreedictionary.com>
- 186 <http://www.diss.fu-berlin.de/2004/127/kap1.pdf>
- 187 <http://www.ubka.uni-karlsruhe.de/indexer-vvv/2004/chem-bio/11>

## **Selbstständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die dem Rat der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Titel „Die konzentrationsabhängige Wirkung der lignanangereicherten Rohextrakte aus dem Leinsamen *Linum usitatissimum* und dem Kürbiskern aus dem Gartenkürbis *Cucurbita pepo* auf die Proliferation von Mammacarcinomzellen *in-vitro*“ ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher in dieser oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde weder im Inland noch im Ausland vorgelegt.

Suhl, den 18.06.2008 .....

## Danksagung

Hiermit danke ich dem stellvertretenden Leiter der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Klinikums Südstadt und Leiter des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik, Herrn Prof. Dr. med. V. Briese, für die Bereitstellung des spannenden und praxisnahen Themas dieser Dissertation sowie für die freundliche Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit.

Für die fachliche Betreuung der Arbeit im Forschungslabor möchte ich insbesondere Frau Dr. rer. nat. D.-U. Richter danken, die die Durchführung der Experimente tatkräftig unterstützte und für alle mit der Arbeit direkt oder indirekt in Zusammenhang stehenden Belange stets ansprechbar war.

In diesem Zusammenhang danke ich ebenfalls dem gesamten Team des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock für die freundliche Unterstützung meiner Dissertationsarbeit.

Frau PD Dr. rer. nat. S. Abarzua danke ich für die Ermöglichung der Herstellung der Rohextrakte sowie für die Zusammenarbeit und die Diskussion sich ergebender Fragestellungen aus biowissenschaftlicher Sicht.

Bedanken möchte ich mich bei Frau K. Bauer für die wertvolle technische Unterstützung und Anleitung bei der Herstellung der Rohextrakte in stets sehr freundlicher und aufgeschlossener Arbeitsatmosphäre.

Ein weiterer Dank gilt Dr. rer. nat. W. Ruth und Katja Neubauer aus dem Institut für Chemie für die freundliche Anleitung und Unterstützung bei der Herstellung der ersten Rohextrakte sowie für die Durchführung der HPLC- Massenspektrometrie des Leinsamenrohextraktes.

Herrn Dr. rer. nat. A. Schlichting danke ich für die technische Durchführung der Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie des Kürbiskernrohextraktes sowie die Hilfestellung bei der Auswertung der für den Mediziner oft schwer verständlichen Analysedaten.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern und meinem Freund Armin, die mich auf dem langen und ab und zu doch recht steinigen Weg zur Dissertation oft aufgemuntert, motiviert und liebevoll unterstützt haben. Ihnen verdanke ich nicht nur den letzten Antriebs durch das „Oster-Ultimatum“, sondern auch die Zuversicht, diese Arbeit erfolgreich abschließen zu können.